

**Quantitative histomorphometrische Analysen  
der Osteotomiezone nach Applikation eines  
neuen resorbierbaren und degradierbaren  
Knochenklebers**

**Ergebnisse einer tierexperimentellen Untersuchung**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des  
Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität  
Giessen**

**Vorgelegt von  
Tim Claßen  
aus Krefeld**

**Giessen 2005**

Aus dem Medizinischen Zentrum für Chirurgie, Anästhesiologie und  
Urologie  
Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. Reinhard Schnettler  
des Universitätsklinikums Giessen

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Schnettler

Gutachter: Prof. Dr. Schulz

Tag der Disputation: 14.02.2006

## Meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Anatomie des Knochens .....	2
1.1.1 Geflechtknochen .....	2
1.1.2 Lamellenknochen .....	2
1.2 Frakturheilung .....	4
1.2.1 Primärheilung .....	4
1.2.2 Sekundärheilung .....	6
1.3 Knochenkleber .....	8
1.3.1 Anforderungen .....	8
1.3.2 Klebstoffgruppen .....	10
1.4 Histomorphometrie .....	14
1.4.1 Allgemeines .....	14
1.4.2 Anwendungen der Histomorphometrie .....	18
1.5 Fragestellung und Zielsetzung .....	21
 <b>2. Material und Methoden .....</b>	 <b>22</b>
2.1 Versuchstiere .....	22
2.2 Versuchsprotokoll .....	22
2.3 Operationstechnik .....	24
2.4 Probenbearbeitung durch die Trenn-Dünnschliff-Technik .....	27
2.4.1 Vorbereitung der Knochenpräparate für die Fixation .....	27
2.4.2 Infiltration .....	28
2.4.3 Einbettung und Polymerisation .....	29
2.4.4 Einteilung der Schnittebenen .....	29
2.4.5 Herstellung eines Dünnschliffes .....	30
2.4.6 Färbetechniken der unentkalkten Knochenschliffe .....	33
2.5 Knochenkleber .....	34
2.5.1 Chemische Zusammensetzung .....	34
2.5.2 Degradation .....	37
2.6 Histomorphometrische Auswertung .....	37
2.7 Statistik .....	45

<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>47</b>
3.1 21- und 42-Tage Kontroll- und Klebgruppen.....	47
3.2 Klebervariante 1 und Kontrollgruppe nach 21 und 42 Tagen.....	52
3.3 Ergebnisse innerhalb eines Osteotomiespalts nach 21 und 42 Tagen.....	57
3.4 Vergleich der Schnittebenen nach 21 und 42 Tagen .....	63
3.5 Vergleich der beiden Klebervarianten nach 21 und 42 Tagen .....	67
 <b>4. Diskussion .....</b>	 <b>73</b>
4.1 Material und Methoden.....	74
4.2 Ergebnisse .....	82
 <b>5. Zusammenfassung .....</b>	 <b>91</b>
 <b>6. Summary .....</b>	 <b>93</b>
 <b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	 <b>94</b>
 <b>8. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....</b>	 <b>117</b>
 <b>9. Tabellenanhang .....</b>	 <b>121</b>
 <b>Danksagung.....</b>	 <b>124</b>
 <b>Lebenslauf.....</b>	 <b>125</b>

## 1. Einleitung

Die Entwicklung von Klebstoffen hat gerade in industriellen Bereichen in den letzten Jahrzehnten enorme Fortschritte gemacht, so dass einige ältere Verbindungsverfahren, wie Schweißen oder Schrauben teilweise abgelöst wurden. Diese Entwicklung konnte in der Chirurgie nicht in gleichem Maße nachvollzogen werden. Noch immer fehlen geeignete Klebstoffe, die die üblichen Verfahren, wie das Nähen der Haut oder die Osteosynthese mit Hilfe von Metallimplantaten, ersetzen oder geeignete Alternativen dazu darstellen. Wobei in der Verbindung von Wundrändern der Haut schon Fibrin- und Cyanoacrylatkleber Einzug in die klinische Praxis gewonnen haben. Dieser Schritt konnte bei der Osteosynthese noch nicht in gleichem Maße nachvollzogen werden, da geeignete Verbundstoffe fehlen.

Speziell in der osteosynthetischen Versorgung bringen bioresorbierbare Klebstoffe einige Vorteile gegenüber der Metallimplantaton mit. Die Erstoperation ist weniger traumatisierend, da man nur an den eigentlichen Ort der Fraktur gelangen muss, um den Klebstoff zu applizieren. Bei der klassischen Osteosynthese muss man zur Einbringung von Osteosynthesematerial oft große Wundflächen erzeugen. Außerdem entfallen Folgeoperationen zur Entfernung der Metallimplantate, da der Kleber resorbiert wird und nicht im Körper verbleibt wie die üblichen Osteosynthesematerialien. Auch kleine Knochenfragmente und Trümmerfrakturen, die mit üblichen Osteosyntheseverfahren nicht fixiert werden können, können geklebt werden. Ein weiterer großer Vorteil von Knochenklebstoffen ist die Möglichkeit der Versorgung von osteoporotischem oder tumorösen Knochen, in dem klassische Osteosynthesematerialien keinen Halt mehr finden. Dieser Vorteil wird heute schon durch den Knochenzement PMMA genutzt. PMMA findet außerdem seine Anwendung zur Verankerung von Prothesenmaterial, wie künstlichen Hüft- oder Kniegelenken.

Die zurzeit zur Verfügung stehenden Kleber besitzen jedoch noch einige Nachteile und können damit die bisherigen Osteosyntheseverfahren noch nicht ersetzen oder alternativ dazu eingesetzt werden. So fehlt einigen die notwendige Klebekraft, andere zeigen eine schlechte Biokompatibilität.

Somit ist ein Knochenkleber, der allen Ansprüchen gerecht wird und die genannten Vorteile bietet, noch nicht gefunden worden.

## **1.1 Anatomie des Knochens**

Jeder Knochen besteht aus einer Substantia compacta und einer Substantia spongiosa. Die Compacta umgibt den Knochen als feste Schicht von Außen, wohingegen die Spongiosa im Inneren des Knochens ein schwammartiges Balkenwerk bildet.

Man unterscheidet histologisch zwei Arten von Knochen: Geflecht- und Lamellenknochen. Diese unterscheiden sich hauptsächlich durch ihre verschiedene Anordnung der Strukturen.

### **1.1.1 Geflechtknochen**

Der Geflechtknochen ist dadurch gekennzeichnet, dass er in seiner Struktur ungeordnet ist. Die Kollagenfaserbündel haben keine einheitliche Verlaufsrichtung. Im Vergleich mit Lamellenknochen hat er weniger Mineralien eingelagert, dafür aber mehr Osteozyten und eine höhere Wachstumsrate. Außerdem ist er nicht so dicht wie Lamellenknochen. Geflechtknochen entsteht eigentlich bei jeder Knochenneubildung, sowohl bei der Knochenbruchheilung, abgesehen von der Primärheilung, als auch während der Entwicklung (Schiebler et al., 1999). Bis auf wenige Ausnahmen wird Geflechtknochen immer in Lamellenknochen umgewandelt (Schenk und Willenegger, 1964).

### **1.1.2 Lamellenknochen**

Kennzeichnend für den Lamellenknochen ist seine regelmäßige Struktur, die sich durch die unterschiedlichen Lamellen und Knochenkanälchen auszeichnet. Die einzelnen Lamellen sind aufgebaut aus Kollagenfasern und Osteozyten. Man differenziert folgende Lamellenarten. Äußere und innere Generallamelle umfassen den gesamten Knochen von Außen und Innen (zum Markraum hin) und setzen sich in die Spongiosabälkchen fort (Abb. 1). Die Speziallamellen sind typisch für die Diaphysen der langen Röhrenknochen und Bestandteil der Osteone oder Havers-Systeme (Junqueira und Carneiro, 1996).

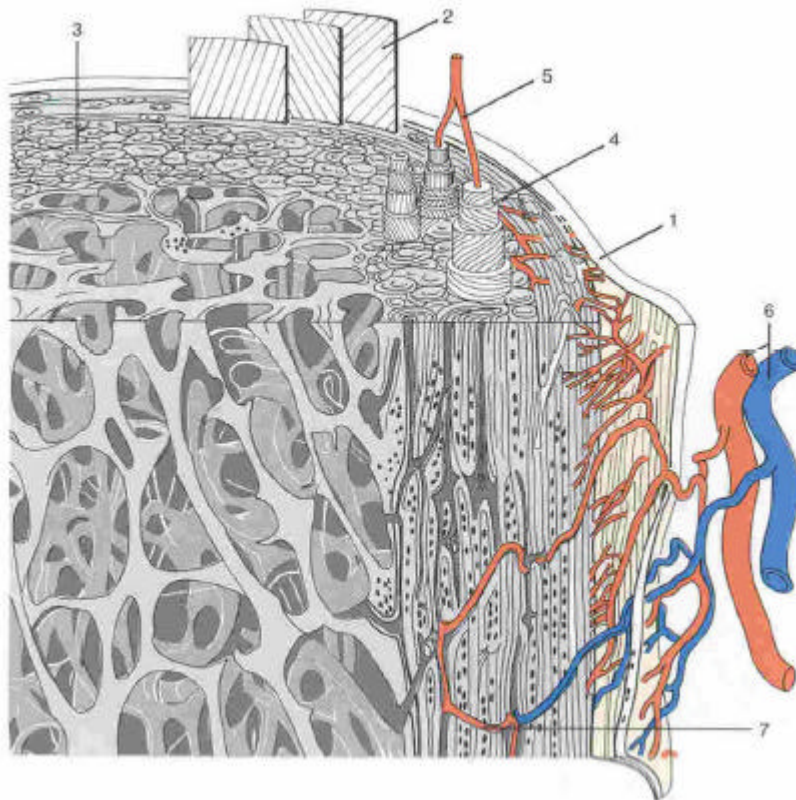


Abb. 1: Dreidimensionale Darstellung des Lamellenknochenaufbaus; 1: Periost; 2: Äußere Generallamelle; 3: Querschnitt durch ein Haverssches System; 4: Die Lamellen eines Osteons sind nach Art eines Teleskopfernröhres auseinander gezogen; 5: Haverssches Gefäß; 6: Vasa nutritia; 7: Querverlaufendes (Volkmannsches) Gefäß (Rauber und Kopsch, 2003).

Osteone sind gekennzeichnet durch einen zentral gelegenen Havers-Kanal, der von 3-20 Speziallamellen umschlossen wird und in dem Blutgefäße und Nerven verlaufen (Abb. 2). Die Osteone verlaufen parallel zur Knochenoberfläche in Längsrichtung. Senkrecht dazu verlaufen die Volkmann-Kanäle, die Gefäße und Nerven vom Periost oder Endost führen. Schaltlamellen (interstitielle Lamellen) sind Lamellenbruchstücke von um- oder abgebauten Osteonen und liegen zwischen den noch vollständigen Osteonen (Junqueira und Carneiro, 1996).

Diese histologische Beschreibung gilt nicht nur für die Kompakta, sondern im Prinzip auch für den spongiösen Knochen. Hier fehlen jedoch regulär gebaute Osteone, und es herrschen hauptsächlich Lamellenbruchstücke vor. Der gesamte Aufbau ist weniger systematisch.



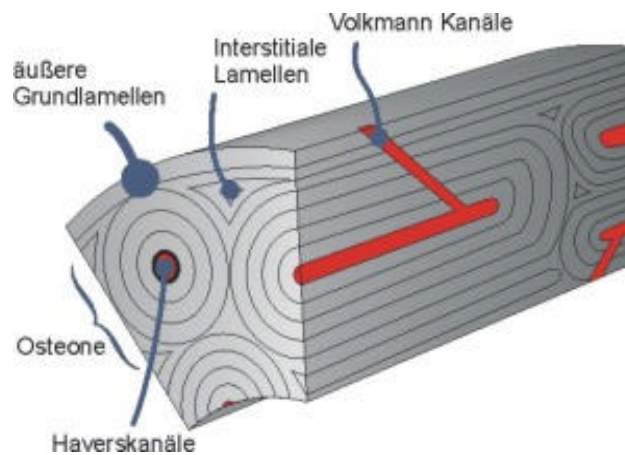


Abb. 2: Darstellung eines Osteons im Lamellenknochen (Lenz, 2003).

## 1.2 Frakturheilung

Der Knochen hat die besondere Fähigkeit sich ständig neuen Anforderungen durch An- und Abbau von Knochen anzupassen und Defekte zu schließen.

Bei der Frakturheilung des Knochens besteht die Besonderheit, im Vergleich mit der Defektheilung anderer Gewebe, dass bei vollständiger Regeneration keine Narbengewebsbildung bleibt, sondern originärer Knochen entsteht. Man unterscheidet zwei verschiedene Knochenheilungsvorgänge. Einmal gibt es die direkte Knochenheilung oder auch Primärheilung genannt, die wiederum auf zwei unterschiedliche Weisen ablaufen kann, nämlich als Kontakt- oder als Spaltheilung. Zum Anderen besteht die Möglichkeit der Sekundär- oder indirekten Knochenheilung, bei der die Heilung über die Zwischenstufe der Kallusbildung abläuft.

### 1.2.1 Primärheilung

Bei der Primärheilung erfolgt die Überbrückung des Frakturspaltes direkt oder primär über Osteone, ohne die Zwischenstufe von Bindegewebe oder Knorpel. Daher ist im Röntgenbild auch keine Kallusbildung zu erkennen. Die Primärheilung lässt sich weiter unterteilen in Kontakt- und Spaltheilung. Zur Primärheilung kommt es grundsätzlich nur bei exakter Reposition der Fraktarenden und absoluter Stabilität (Abb. 3a). Dies ist z.B. der Fall bei stabiler osteosynthetischer Versorgung von Frakturen (Niethard und Pfeil, 1997).

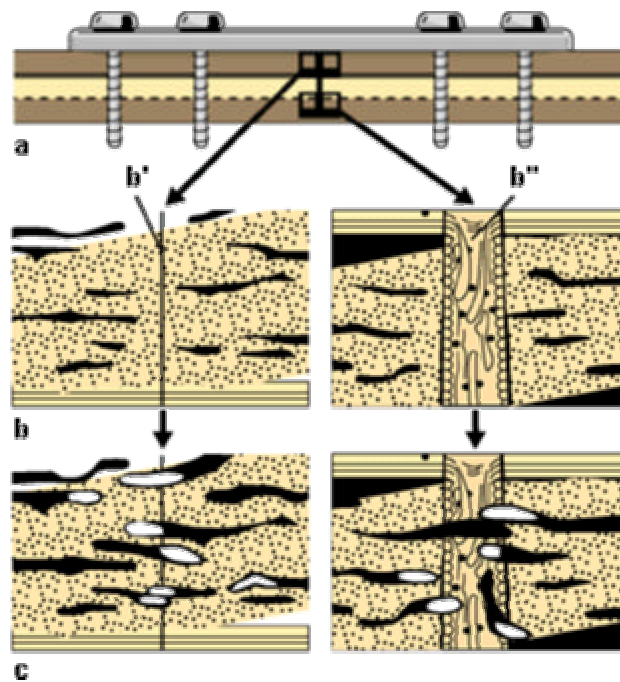


Abb. 3: a: Primärheilung bei stabiler Osteosynthese; b'+c: Kontaktheilung; b''+c: Spalthheilung (Reiche, 2003).

## Kontaktheilung

Wie aus dem Namen zu ersehen, besteht bei der Kontaktheilung ein direkter Kontakt zwischen den beiden Korkalisenden (Abb. 3b'+c). Dies wird meistens nur durch experimentell erzeugte Sägeschnittosteotomien erreicht (Schenk und Hunziker, 1994, Schenk und Willenegger, 1977). Bei der Kontaktheilung kommt es zu einem Vorgang, der sich Remodelling nennt. Die jeweiligen Osteone, die den Frakturspalt begrenzen, bilden Resorptionskanäle aus. Diese Resorptionskanäle werden nach Frost (Frost, 1966) als BMU (Basic Multicellular Unit, später auch Bone Metabolising Unit) bezeichnet. Sie befolgen bei der Knochenheilung die ARF-Regel: Aktivierung-Resorption- Formation (Schenk, 1978). Nach der Aktivierung bilden diese Resorptionskanäle eine Spitze (cutting cones) aus, die mit Osteoklasten besetzt ist, und deren hinteres Ende mit Osteoblasten belegt ist. An der Spitze findet daraufhin eine Knochenresorption statt, womit sich der Resorptionskanal durch den Knochen fortbewegen kann. Am Ende des Resorptionskanals erfolgt gleichzeitig die Knochenneubildung (Formation).

## **Spaltheilung**

Bei der Spaltheilung sind die Knochenenden nicht exakt aneinandergelegt, es existiert ein schmaler Spalt zwischen den Fraktarenden (Abb. 3b''+c). Dies ist fast immer der Fall, da es selbst bei makroskopisch exakter Reposition meist nicht möglich ist einen absolut kongruenten Flächenkontakt herzustellen. Dieser Spalt darf allerdings maximal 0,5 mm breit sein und nur eine geringe Verschiebung der Enden aufweisen, ansonsten kommt es zur Sekundärheilung (Schenk und Willenegger, 1977).

Zunächst sprießen neue Blutgefäße und lockeres Bindegewebe in den Spalt ein, so dass die Blutversorgung nach zwei Wochen abgeschlossen ist. In den Frakturspalt wandern mesenchymale Stammzellen ein, die sich zu Osteoblasten differenzieren und beginnen lamellären Knochen zu bilden. Der neu gebildete Knochen ist jedoch nicht optimal, also nicht parallel zur Knochenoberfläche, im Frakturspalt ausgerichtet, wie es sonst der Fall ist. Dieser lamelläre Knochen folgt dem Verlauf der einsprossenden Kapillaren. Diese erste Verbindung ist aber noch schwach, und die Biegefestigkeit beträgt nur 30% der normalen Belastbarkeit (Brückner und Hinze, 1991). Doch dann werden nach drei bis vier Wochen von sowohl altem, wie auch neuem Knochen, Resorptionskanäle gebildet. Sie verbinden den neu gebildeten Lamellenknochen mit dem bestehenden Knochen der Fraktarenden. Nach einiger Zeit ist dann die ursprüngliche Anatomie und Stabilität wieder hergestellt, und der lamelläre Knochen ist längs zu den Fraktarenden ausgerichtet. Da die Bildung von Knochen hier ohne Zwischenstufe abläuft, und die Zellen aus den einsprossenden Blutgefäßen stammen, wird diese Knochenbildung auch primär angiogene Knochenbildung genannt (Johner, 1972, Willenegger, 1971).

### **1.2.2 Sekundärheilung**

Charakteristisch für die indirekte Knochenheilung ist die Bildung von Knochen über eine Zwischenstufe aus Bindegewebe und Knorpel, dem sogenannten Kallus (Willenegger, 1971). Bei der Sekundärheilung ist die Stabilität und Spaltbreite, die für die Primärheilung erforderlich ist, nicht mehr gegeben. Bereiche im Frakturspalt sind derart instabil und stehen so unter interfragmentären Zug, dass keine Anlagerung von Knochen möglich ist. Ebenfalls ist es möglich, dass die Blutversorgung in dem

Frakturbereich nicht ausreichend ist. Diese Bedingungen werden meistens bei konservativ versorgten und teilweise auch bei osteosynthetisch stabilisierten Frakturen erfüllt (Berchtold et al., 1994).

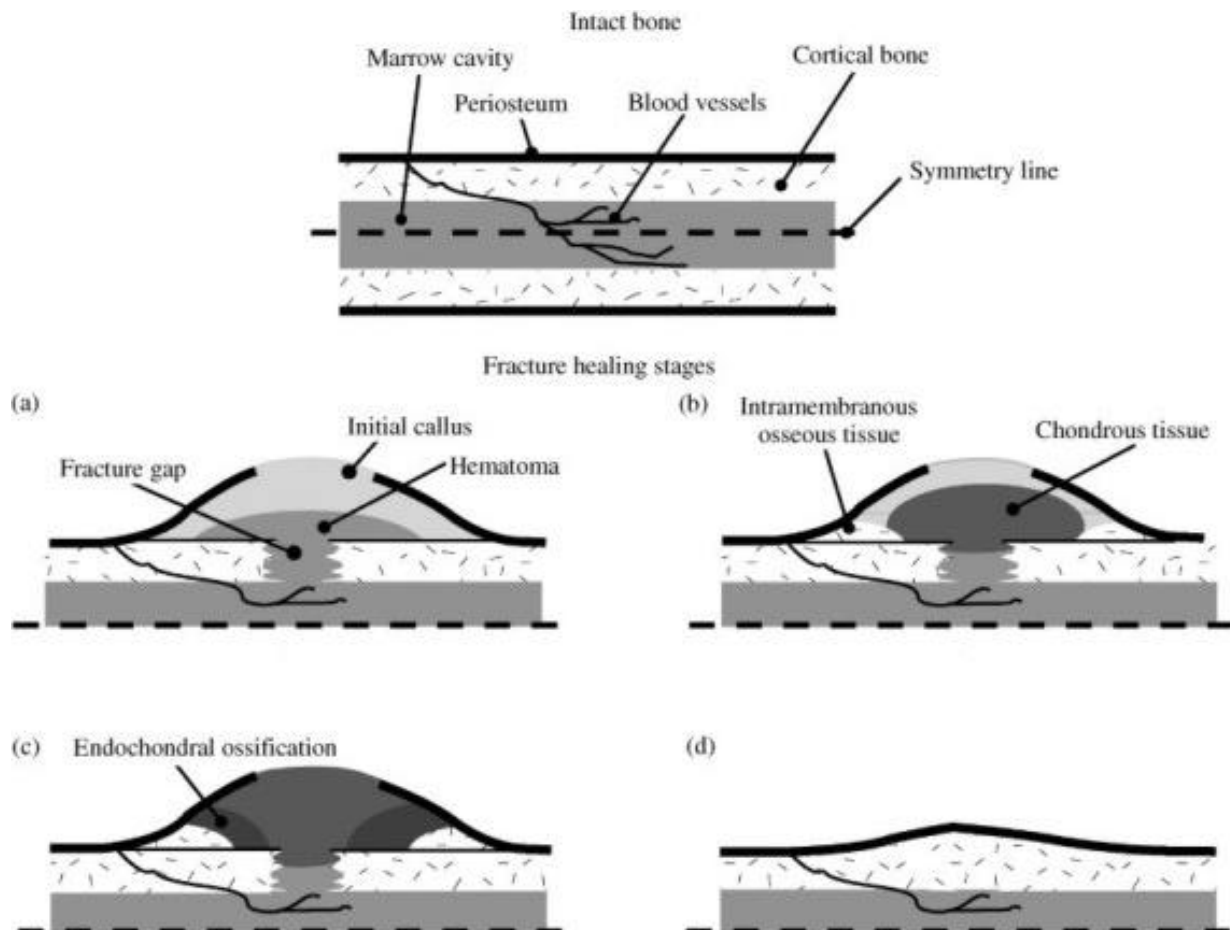


Abb. 4: Verschiedene Stadien der Sekundärheilung; a: Entstehung des initialen Kallus mit Hämatom; b: Bildung von Ersatzgewebe; c: Geflechtknochenbildung; d: Herstellung der originären Struktur durch Lamellenknochen (Lenz, 2003).

Zu Beginn der Sekundärheilung werden die Fragmentenden soweit resorbiert, dass der interfragmentäre Zug verringert, und der Frakturspalt verbreitert wird. Des Weiteren wird nekrotisches Knochengewebe an den Frakturenden abgebaut (Brückner und Hinze, 1991). Es müssen erst Materialien im Frakturspalt abgelagert werden, die zum einen unter diesen Bedingungen überleben können und zum anderen das Wachstum von Knochengewebe ermöglichen. Deshalb entsteht zunächst ein Ersatzgewebe, das aus Bindegewebe und Faserknorpelzellen besteht und später durch Geflechtknochen ersetzt wird. Die indirekte Knochenbildung

durchläuft dabei verschiedene Stadien (Frisch und Bartl, 1999). Es beginnt zuerst mit einer Entzündungsreaktion, ausgelöst durch Blut, nekrotisches Gewebe und mangelnde Blutzufuhr (Abb. 4a). Es folgt das Eindringen von Granulationsgewebe schon am 2. Tag. Daraus bildet sich ein weicher Kallus aus Bindegewebe und Faserknorpel, der mit der Zeit die Fragmente zunehmend stabilisiert (Abb. 4b). Anschließend beginnt das Wachstum von Geflechtknochen, der den bindegewebigen Kallus als Leitstruktur nutzt (Schenk und Willenegger, 1964) und durch appositionelles Wachstum mit der Zeit den ganzen Frakturspalt ausfüllt (Abb. 4c).

Mit der nun erzielten ausreichenden Stabilität erfolgt als letzter Schritt die Bildung von lamellären Knochen und damit die Wiederherstellung der originären Struktur (Abb. 4d). Resorptionskanäle der Osteone verdrängen mit der Zeit den Geflechtknochen und ersetzen ihn durch Lamellenknochen nach dem Prinzip der angiogenen Knochenbildung und der Remodellierung (Bunker, 1992).

## **1.3 Knochenkleber**

### **1.3.1 Anforderungen**

Knochenkleber im Allgemeinen werden zu den Biomaterialien gezählt. Unter Biomaterialien versteht man alle Materialien, die mit den menschlichen Zellen, Geweben oder Körperflüssigkeiten in Kontakt treten. Darunter zu zählen sind z.B. chirurgische Implantate, Materialien in der Prothetik, aber auch Materialien in extrakorporalen Kreisläufen (Lee, 1988). Williams führte 1988 eine Definition des Begriffes Biomaterial ein: Jegliche Substanz oder Kombination von Substanzen, die synthetischen oder natürlichen Ursprungs ist und für jeden möglichen Zeitraum als Ganzes oder Teil eines Behandlungssystems irgendein Gewebe, ein Organ oder eine Körperflüssigkeit behandelt oder ersetzt (Williams, 1988).

Für Biomaterialien ist jeweils ihre spezielle Funktion entscheidend, aber vor allen Dingen auch ihre Biokompatibilität. Das heißt, dass Biomaterial darf nicht toxisch, kanzerogen oder mutagen wirken. Ebenfalls darf es nicht zu einer Sensibilisierung führen und muß im Falle von Gewebsimplantaten adhäsiv für Zellen sein (Kawahara, 1985).

Einige grundlegende Begriffe der Biokompatibilität sind (Williams, 1988):

- Zellmigration
- Zelladhärenz
- Zellproliferation
- Zellwachstum
- Zelldifferenzierung
- Toxizität
- Kanzerogenität
- Mutagenität

Stoffe, die diese Bedingungen erfüllen, werden als inert bezeichnet und zeigen im Körper keine Abstoßungsreaktionen (Hench und Wilson, 1984).

Dabei sind noch zu erwähnen die bioaktiven Materialien, die körpereigenen Stoffen ähneln und sich physiologisch in das Gewebe einfügen. Mit Knochen können diese eine direkte chemische Verbindung eingehen (Verbundosteogenese). Teilweise können sie auch die Bildung von Knochen induzieren (Osborn, 1985).

Biotolerante Materialien werden meist bindegewebig eingeschlossen, sind jedoch nicht toxisch (Kamen, 1989).

An einen Knochenkleber werden bestimmte Anforderungen gestellt (Meyer et al., 1979, Al-Khawam et al., 1983, Claes et al., 1997):

- stabil und sterilisierbar
- einfach aufzutragen
- voll resorbierbar, in der Zeit der Knochenneubildung
- Festigkeit der Verbindung sollte der des ursprünglichen Gewebes entsprechen
- schnelle Aushärtungszeit
- keine Barriere für das Knochenwachstum
- Aushärtung möglichst temperatur- und pH-neutral
- nicht toxisch, kanzerogen oder mutagen

Ein Knochenkleber besitzt viele Vorteile, vor allem im Vergleich mit der Alternative Metallimplantat. Bei der Operation mit einem Metallimplantat findet immer gleichzeitig

eine massive Gewebeerstörung in Form von gesundem Knochen und Gefäßen statt, da zur Einbringung des Osteosynthesematerials oftmals viel gesunder Knochen freigelegt werden muss. Für die Anwendung eines Knochenklebers muss meist nur das eigentlich frakturierte Knochenstück freipräpariert werden. Die Kraft verteilt sich bei der Knochenklebung über die gesamte Fläche des Kontaktes der Knochenenden und nicht punktuell, wie bei Metallimplantaten. Gleichzeitig können Unebenheiten ausgeglichen werden (Wenz, 1998). Bei der klassischen Osteosynthese ist fast immer ein Zweiteingriff zur Entfernung des Implantats notwendig. Das Metall ist ein Fremdkörper im Organismus, und es gibt Hinweise, dass sich z.B. Titan löst und in inneren Organen gespeichert wird (Obwegeser, 1998). Kleine Knochenfragmente oder Trümmerfrakturen können zwecks exakter Reposition geklebt werden, wenn hier z.B. eine Schraube viel zu groß wäre (Perry und Youngson, 1995). Von Nutzen ist ein Kleber daher z.B. in der HNO bei der Chirurgie an Mittelohrknochen (Tabb, 1968). Ebenfalls wäre zu denken an das Verkleben von osteoporotischem Knochen in dem Metallimplantate keinen Halt mehr finden (Müller, 1962). Des Weiteren können osteolytisch veränderte Knochen, z.B. durch Metastasen oder Tumore, mit Knochenklebern behandelt werden, wenn sie frakturieren und eine herkömmliche osteosynthetische Versorgung nicht mehr möglich ist (Anderson et al., 1978, Cameron et al., 1975, Harrington et al., 1976). Außerdem werden Knochenkleber oder -zemente bei der Verankerung von Prothesen angewendet (Charnley und Kettlewell, 1965).

### **1.3.2 Klebstoffgruppen**

Es sind hauptsächlich fünf verschiedene Arten von synthetischen Knochenklebern oder -zementen bekannt: Cyanoacrylate, Polyurethane, Polymethylmethacrylate, Epoxydharze, Fibrinkleber. Teilweise finden diese ihre Einsatzgebiete vor allen Dingen bei der Verankerung von Prothesen oder der Fixierung von kleinen Knochendefekten.

Die Cyanoacrylate wurden 1959 von Coover et al. (Giebel und Rimpler, 1981) entwickelt. Davon ausgehend sind verschiedene Derivate hergestellt worden. Das einfachste ist Methyl-2-Cyanoacrylat. Weitere Derivate besitzen mehr C-Atome, wie Ethyl-, Butyl und Isobutyl-2-Cyanoacrylat. Die flüssigen Monomere polymerisieren bei

Zusatz von Wasser zu einem festen Polymer (Al-Khawam et al., 1983). Sie besitzen eine starke Haftkraft vor allen Dingen auch in feuchter Umgebung (Smith, 1973). Ihre Adhäsionskraft lässt jedoch mit ansteigender Zahl von C-Atomen nach, wobei Elastizität und Polymerisationszeit zunehmen (Bhat et al., 1992, Harris und Tebby, 1986, Brauer et al., 1979). Dafür nimmt die oftmals beobachtete Toxizität mit längerer Seitenkette aber auch ab (Linden und Shalaby, 1997). Man nimmt an, dass diese Toxizität vor allen Dingen von den Abbauprodukten herrührt, nämlich Formaldehyd und den jeweiligen Alkyl-Cyanoacetaten (Cameron et al., 1965). Auch karzinogene Wirkungen für Methyl-Cyanoacrylate werden beschrieben (Donkerwolcke et al., 1998). Ebenso zeigen zahlreiche Studien Fistelbildungen, Infektionen und die fehlende Haftfestigkeit (Corn et al., 1972, Heiss und Schnettler, 2003, Hunter, 1976, Kaufman, 1974, Kerr und Smyth, 1971, Rutsik et al., 1975, Shapiro, 1973, Tiling et al., 1979).

Der Cyanoacrylatkleber hat zwar den großen Vorteil abgebaut werden zu können, jedoch bildet der Kleber eine Barriere für die Knochenheilung (Giebel und Rimpler, 1981). Des Weiteren ist eine recht hohe Polymerisationstemperatur als nachteilig anzusehen, die umliegendes Gewebe zerstören kann (Meyer et al., 1979).

Der Kleber findet seine Anwendung vor allen Dingen auch in der Verklebung von Weichteilgewebe, wie Haut, Leber, Lunge oder Niere (Silver, 1976, Matsumoto, 1970).

Auch heute noch steht die Verklebung von Weichteilgewebe im Vordergrund bei der Anwendung von Cyanoacrylatkleber. So wird der Kleber bei Gefäßfehlbildungen, Schleimhauttransplantaten oder bronchopleuralen Fisteln nach Lungenoperationen verwendet (Gallemore et al., 1999, Hirata et al., 2002, Maldonado et al., 2003). Ebenso gibt es experimentelle Untersuchungen zur Anwendung des Klebers bei Kraniotomien von Kaninchen (Shermak et al., 1998).

Ostamer ist das bekannteste und am besten untersuchte Polyurethan. Es erschien als ein hoffnungsvoller Kleber, da er unter Hohlraumbildung polymerisiert, und Knochen in diese Hohlräume einwachsen konnte. Problematisch erschien jedoch zum einen die hohe Polymerisationstemperatur von bis zu 70°C, zum anderen die schlechte Adhäsionskraft (Giebel und Rimpler, 1981). Außerdem wird der Kleber nicht resorbiert, sondern bindegewebig abgekapselt (Donkerwolcke et al., 1998). Des Weiteren zeigten sich bei tierexperimentellen Studien Pseudoarthrosen, Infektionen,



Wundheilungsstörungen und Nekrosen (Gilmer et al., 1961, Redler, 1960, Müller, 1962).

Polyurethan als Kleber findet heutzutage wenig Verwendung, jedoch nutzt man seine Hohlrumbaueung zum Auffüllen von Knochendefekten. Das polymerisierte Polyurethan dient dabei als Gerüstmaterial für den einwachsenden Knochen (Rozhnova et al., 2002, Spaans et al., 2000).

Als Knochenzement für Prothesen etablierte sich das Polymethylmethacrylat (PMMA), auch bekannt unter dem Namen Palacos®. Seit den dreißiger Jahren schon wurde PMMA in der Zahnmedizin verwendet (Donkerwolcke et al., 1998). Erst später wurde PMMA als Knochenzement zur Verankerung von Hüftprothesen entdeckt (Charnley und Kettlewell, 1965, Charnley, 1960) und als solcher ist er auch heute noch hauptsächlich in Gebrauch. Er wird kaum als Kleber von Frakturen genutzt, da sich zeigt, dass PMMA nicht resorbiert wird (Müller, 1962). Dafür kann es als Stabilisator und Raumfüller von osteoporotischem und tumorösen Knochen genutzt werden (Anderson et al., 1978, Cameron et al., 1975, Harrington et al., 1972, Harrington et al., 1976, Kennedy, 1978, Lubicky und DeWald, 1982, Schatzker, et al., 1978). PMMA zeigt keine Toxizität, bis auf eine leichte Fremdkörper-Riesenzellenreaktion (Albrektsson und Linder, 1981, Cabanela et al., 1972, Charnley et al., 1968, Linder, 1977, Sherman et al., 1983, Sorensen et al., 1979). Einzig das Monomer zeigt zytotoxische Eigenschaften, weshalb der Zement vor Einbringung in den Körper einige Zeit durchgearbeitet werden sollte. PMMA geht keine wirkliche Adhäsion mit dem Knochen ein, sondern verzahnt sich mit dem trabekulären Knochen (Smith, 1971). So entsteht auch das Problem, dass bei einem Prothesenwechsel große Teile von an die Prothese heranreichendem Knochen mit entfernt werden muss. Ein weiteres Problem ist die Fragmentierung des Zements nach einiger Zeit, wodurch sich Fremdkörperreaktionen in der Nähe der Prothese zeigen, und sich die Prothese außerdem lockert (Jasty et al., 1986, Lennox et al., 1987). PMMA zeigt ebenfalls, wie andere Kleber, eine recht hohe Polymerisationstemperatur (Müller, 1962).

PMMA wird als Knochenzement auch heute noch vor allen Dingen bei der prothetischen Versorgung und bei Versorgung von tumorösen oder osteoporotischem Knochen verwendet. Speziell in den letzten Jahren benutzte man für die Vertebroplastie PMMA als Stabilisator von gesinterten Wirbelkörpern (Winking et al., 2003). Außerdem setzte man den Knochenzement als Füllstoff bei

subchondralen Defekten des Femurs ein (Welch et al., 2002). Zusätzlich nutzt man PMMA als Medikamententräger, vor allen Dingen für Antibiotika (Breusch und Kuhn, 2003). In der Ophthalmologie nutzt man PMMA als Basis für Kunstlinsen (Hubaille et al., 2001).

Epoxydharze wurden ebenfalls als Knochenkleber untersucht. Sie zeigen jedoch eine mangelnde Verbundfähigkeit, besonders an fettigen oder feuchten Knochen. Außerdem entstanden auch hier hohe Polymerisationstemperaturen. Ein weiteres Problem ergibt sich durch die mangelnde knöcherne Durchbauung des Klebers und die nicht stattfindende Resorption (Giebel und Rimpler, 1981). Es gibt auch Hinweise auf chronische Entzündungsreaktionen und Toxizität des Klebers (Smith, 1973).

Die Anwendung der Epoxydharze beschränkt sich heute hauptsächlich auf den zahnmedizinischen Bereich. Dort werden sie zur Versiegelung von Wurzelkanälen benutzt (Britto et al., 2002, Mannocci und Ferrari, 1998).

Die meisten Fibrinkleber sind Mixturen aus Fibrinogen, Thrombin, Calcium und Faktor XIII (Donkerwolcke et al., 1998). Sie stellen den physiologischsten Kleber dar und zeigen deshalb auch keine allergischen oder toxischen Reaktionen. Daraus ergeben sich auch weitere Vorteile. Sie werden innerhalb kurzer Zeit ohne Gewebereizung abgebaut, wobei diese Zeit zu kurz für die knöcherne Durchbauung sein kann. Des Weiteren zeigen sie keine hohen Polymerisationstemperaturen, wie bei den übrigen Klebern (Giebel und Rimpler, 1981). Darüber hinaus gibt es Untersuchungen, die eine Beschleunigung der Heilung, Blutstillung und verbesserte Revaskularisation beschreiben (Donkerwolcke et al., 1998; Arbes et al., 1981, Boehler et al., 1977, Bosch, 1981, Bosch et al., 1977, Bosch et al., 1981). Das größte Problem des Fibrinklebers ist seine mangelnde Klebefestigkeit, die es ihm nicht ermöglicht eine stabile Fixation zu erreichen, abgesehen von nicht stark belasteten, kleinen Bruchstücken, Spongiosaplastiken und Knochen-Knorpeltransplantationen (Giebel und Rimpler, 1981, Schlag und Redl, 1988).

Die Fibrinkleber sind heutzutage in der Medizin weit verbreitet. Jedoch liegt die Anwendungsmöglichkeit hauptsächlich bei den Weichteilgeweben. So werden vor allen Dingen Leber- und Milzverletzungen, intestinale und Gefäßanastomosen sowie Hautwunden mit Hilfe von Fibrinklebern versorgt (Park et al., 2002, Pelayo et al., 2002, Sperling und Hartmann, 2001). Als Knochenkleber im eigentlichen Sinne wird

der Fibrinkleber kaum verwandt. Eher versucht man seine heilungsbeschleunigende Wirkung zu nutzen und verwendet ihn zusammen mit mesenchymalen Stammzellen, periostalen Zellen oder Hydroxylapatitzement (Isogai et al., 2000, Nakamura et al., 1998, Yamada et al., 2003).

Zusammenfassend kann man sagen, dass derzeit noch kein Knochenkleber entwickelt wurde, der eine ausreichende Verbundfähigkeit und gleichzeitig eine so gute Biokompatibilität besitzt, um die zur Zeit üblichen Osteosyntheseverfahren zu ersetzen oder eine geeignete Alternative zu ihnen darzustellen.

Als Knochenzement hat sich PMMA zwar etabliert, jedoch ist es ungeeignet für die Versorgung von nicht pathologischen Frakturen, da dieser nicht resorbiert wird.

Fibrin als Knochenkleber wird dagegen gut resorbiert, besitzt dafür aber eine mangelnde Adhäsionskraft.

## **1.4 Histomorphometrie**

### **1.4.1 Allgemeines**

Die Histomorphometrie beschäftigt sich mit der Messung von zwei- und dreidimensionalen Strukturen in histologischen Präparaten. Bei der Knochenhistomorphometrie werden histologische Strukturen von Knochengewebe quantitativ beurteilt, z.B. die Oberfläche oder der Umfang von Knochen trabekeln.

Mit der Knochenhistomorphometrie ist es möglich quantitativ Knochenaufbau und auch Knochenumbau zu beschreiben. Sie kann Informationen liefern, die andere Messverfahren, wie die Knochendichtemessung oder biologische Marker des Knochenumbaus nicht erbringen (Compston, 1998). Insbesondere hat man ein zu großen Teilen objektives Verfahren der Knochenstrukturanalyse zur Hand.

Die Grundlage der Histomorphometrie ist die Möglichkeit der Bestimmung des Volumens eines Körpers aus dessen Flächenausdehnung und die Ermittlung der Oberfläche aus der Längenausdehnung. Es wird also von einem zweidimensionalen auf einen dreidimensionalen Parameter geschlossen. Dieses Prinzip von Delesse von 1866 sagt, dass sich das Verhältnis zweier Flächen im Querschnitt genauso darstellt, wie die Relation zweier Volumina im Raum. Voraussetzung dafür ist eine isotrope Substanz (Schwartz und Recker, 1981).

Hennig beschrieb als eines der ersten Messverfahren das Punktezählverfahren, mit dem die Bestimmung der Flächen- und Längenausdehnung eines Objekts möglich war. Dieses Messverfahren gilt jedoch nur für ungerichtete und zufällig orientierte (isotrope) Strukturen. Die Trabekelstruktur des Knochens ist jedoch zum größten Teil gerichtet und orientiert (anisotrop) (Henning, 1956).

Speziell für die Spongiosastruktur entwickelte Merz das Punktezählverfahren weiter, indem er statt der geraden Messstrecken halbkreisförmige oszillierende Wellenlinien verwendete. Hierdurch wurde die Messung relativ richtungsunabhängig und gilt somit auch für anisotrope Strukturen, wie den trabekulären Knochen. Ein Netz mit 100 Punkten und 10 Halbkreiswellenlinien wird in ein Okular eingelegt. Dann werden die Treffer (Punkte des Netzes) mit dem Knochen ausgezählt. Hieraus ergibt sich die Fläche. Des Weiteren werden die Schnittpunkte der Halbkreiswellenlinien mit der Knochenoberfläche bestimmt und die Größe der Oberfläche wird so ermittelt (Merz, 1967).

Eine quantitative Erfassung der zweidimensionalen trabekulären Mikroarchitektur wird durch die „Strut“- Analyse (Compston et al., 1987) ermöglicht, mit der die Trabekel topologisch klassifiziert werden. Mittels Bildverarbeitung erfolgt eine computerunterstützte Untersuchung von unentkalkten Knochenschnitten, indem automatisch Knoten („nodes“), freie Enden („free ends“) und eine Anzahl topologisch definierter Balken (Knochenbälkchen oder „struts“) identifiziert und quantifiziert werden. Die erwähnten Parameter geben bestimmte Merkmale der Trabekel wieder, z.B. Knoten, die eine Vereinigung von drei oder mehr Bälkchen darstellen, oder freie Enden (Termini) von einzelnen Knochenbälkchen. Die Bälkchen mit einem freien Ende verhalten sich dabei umgekehrt proportional zur trabekulären Vernetzung, während solche, die zwei Knoten verbinden für eine gute Verknüpfung der Trabekel sprechen (Compston et al., 1993).

Diese Methode wurde durch Benutzung eines durch Mikrocomputer betriebenen Bildanalysesystems erweitert (Aaron et al., 1992), welches die schnelle Bestimmung des Knochenvolumens, der Trabekeloberfläche und eine Berechnung der Trabekelbreite ermöglicht. Nach diesen Messungen wird das Bild in Umrissen dargestellt und Trabekellänge, -anzahl und -eigenschaften, sowie die Anzahl der trabekulären Verbindungen und Unterbrechungen bestimmt. Die computerunterstützten Analysesysteme haben jedoch den Nachteil, dass sie die

einzelnen Zellarten des Knochens nicht voneinander unterscheiden können. Das bringt mit sich, dass die interaktive Mitarbeit des Untersuchers erforderlich ist.

Die Parameter werden als area, perimeter oder width beschrieben, wenn es sich um zweidimensionale Ergebnisse handelt. Dreidimensionale werden als volume, surface oder thickness ausgedrückt (Parfitt, 1988).

Folgende histomorphometrischen Parameter wurden nach der internationalen Klassifikation für die vorliegende Arbeit ermittelt (Delling, 1975, Frost, 1983, Parfitt et al., 1983, Parfitt, 1983, Vesterby et al., 1989):

**TV**= Tissue Volume [ mm<sup>3</sup> ] : Gewebevolumen

**BV**= Bone Volume [ mm<sup>3</sup> ] : Knochenvolumen

**BS**= Bone Surface [ mm<sup>2</sup> ] : Knochenfläche, zweidimensionales Gegenstück zu BV

**TBV**= Trabecular Bone Volume [ % ]

Als Parameter für die Knochendichte im Frakturspalt dient das trabekuläre Knochenvolumen (trabecular bone volume). Ausgehend von der Messung der Knochenfläche in Bezug auf die Messfeldfläche auf dem Präparat wird das TBV als Volumenanteil des Knochens (BV) in einem Gewebevolumen (TV) in Prozent bestimmt.

Das TBV ist der maßgeblichste Parameter bei der Knochenhistomorphometrie.

$TBV = BV/TV \cdot 100 \text{ [\%]}$

**S\*v**= bone surface area per unit volume of tissue [ mm<sup>2</sup>/mm<sup>3</sup> ]

Oberflächendichte: Grenzfläche der Spongiosa mit dem Markraum (BS) pro Volumeneinheit Gesamtknochengewebe (TV). Maß für die Grenzfläche der Spongiosa mit dem Markraum pro Volumeneinheit Gesamtknochengewebe. Ist bei

unvollständig trabekuliertem Knochen am höchsten. Fällt aber ab einem bestimmten Punkt, bei stärker zunehmender Porosität, wieder ab (Frost, 1983).

$$S^*v = BS/TV \text{ [mm}^2/\text{mm}^3\text{]}$$

$$S/V = \text{bone surface area per unit volume of bone [ mm}^2/\text{mm}^3 \text{]}$$

Spezifische Trabekeloberfläche: Oberfläche der Spongiosa (BS) in Relation zu einer Volumeneinheit Spongiosa (BV). Steigt bei porösem Knochen an, z.B. bei Osteoporose (Frost, 1983).

$$S/V = (S^*v/TBV) * 100 = BS/BV \text{ [mm}^2/\text{mm}^3\text{]}$$

$$MTPT = \text{mean trabecular plate thickness [ } \mu\text{m ]}$$

Mittlere trabekuläre Dicke: Wird ermittelt über die spezifische Trabekeloberfläche (S/V). Sie ist ein Indikator für die Verteilung des trabekulären Knochens (Frost, 1983).

$$MTPT = 2000/(S/V) \text{ [}\mu\text{m]}$$

$$MTPD = \text{mean trabecular plate density [ mm}^{-1} \text{]}$$

Mittlere trabekuläre Dichte: Die Berechnung erfolgt über die Oberflächendichte ( $S^*v$ ). Sie korreliert mit der Möglichkeit, dass eine Testlinie, die durch den Knochen gelegt wird, mit einem Knochenelement zusammentrifft (Parfitt et al., 1983).

$$MTPD = S^*v/2 \text{ [mm}^{-1}\text{]} \text{ oder } TBV*10/MTPT$$

**MTPS**= mean trabecular plate separation [  $\mu\text{m}$  ]

Mittlere trabekuläre Separation: Für die Berechnung werden das trabekuläre Knochenvolumen (TBV) und die mittlere trabekuläre Dicke (MTPT) benötigt. Es ist ein Index für die Distanz zwischen den Trabekeln (Parfitt et al., 1983).

$\text{MTPS} = \text{MTPT}(100/\text{TBV}-1)$  [ $\mu\text{m}$ ]

**Marrow Space Star Volume** [  $\text{mm}^3$  ]

Das durchschnittliche Volumen aller Anteile eines Objektes, welche unverdeckt in alle Richtungen des Raums von einem zufällig gewählten Punkt aus sichtbar sind (Gundersen et al., 1988). Es ist ein Maß für die dreidimensionale trabekuläre Vernetzung.

#### 1.4.2 Anwendungen der Histomorphometrie

Die Histomorphometrie ist eine beliebte Methode in der experimentellen Forschung zur Untersuchung von Knochenwachstum und -verteilung, da sie weitgehend untersucherunabhängige, objektive und quantitative Ergebnisse liefert. Dazu ist es eine teilweise zeitsparende Methode.

In zahlreichen Studien wird immer wieder auf die Histomorphometrie zurückgegriffen, um subjektive, meist histologisch ermittelte, Ergebnisse zu bestätigen oder zu bekräftigen. Besonders beliebt ist die Methode bei der Untersuchung der Osteoporose (Alexandre et al., 1988, Ritzel et al., 1996, Kimmel et al., 1990), der Analyse von Knochenstoffwechselkrankheiten (Recker, 1994, Eriksen et al., 1989, Bullough et al., 1990). Außerdem werden damit Auswirkungen verschiedener Stoffwechseleränderungen oder deren Behandlung auf den Knochen untersucht (Guichelaar et al., 2002, Pataki et al., 1997, Dobing und Turner, 1997).

Außerdem wird die Histomorphometrie zur Beurteilung der Frakturheilung genutzt. Sowohl der Einfluss von Allgemeinerkrankungen und osteoinduktiver Stoffe, als auch

die Beurteilung von Knochenklebern oder -zementen wird mit Hilfe dieser Methode untersucht.

So zeigte man unter anderem mit Hilfe der Histomorphometrie den positiven Einfluss von verschiedenen beschichteten osteosynthetischen Materialien auf die Frakturheilung (Raschke et al., 2002, Lewandrowski et al., 2002, Schmidmaier et al., 2000). Ebenso konnte so die osteoinduktive Wirkung der systemischen, als auch lokalen Applikation von Wachstumshormonen gezeigt werden (Schmidmaier et al., 2001, Bail et al., 2002).

Die Histomorphometrie findet seine Anwendung auch bei dem Vergleich nichtinvasiver Untersuchungsmethoden zur Beurteilung der Frakturheilung, indem es invasive Vergleichswerte liefert (Rose et al., 1987).

Histomorphometrische Untersuchungen werden auch eingesetzt, um den Einfluss von Stoffwechselkrankheiten, wie Diabetes Mellitus, oder die Einflussnahme von Medikamenten auf die Frakturheilung zu zeigen (Alkan et al., 2002, Fini et al., 1999).

Die Beeinflussung der Frakturheilung durch mechanische Faktoren, wie Zug oder Druck, war Untersuchungsobjekt mehrerer Studien, die die Fragestellung jeweils mit der Histomorphometrie lösten. So zeigte sich, dass Zugkräfte im Frakturspalt zu Beginn einen verminderten Volumenanteil an neuem Knochen bewirken. Im Verlauf jedoch konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden (Durnova et al., 2002, Welch et al., 1998). Druckkräfte im Bruchspalt durch Plattenfixation, sowie durch Körpergewicht, zeigten keinen oder einen positiven Effekt auf das Knochenwachstum (Holmstrom et al., 1986, Meadows et al., 1990).

Die Frakturheilung der Mandibula untersuchten Zheng und Wang. Sie zeigten, dass das Knochenwachstum am oberen Teil des Frakturspalts im Vergleich zum unteren Anteil vermehrt war (Zheng und Wang, 1996). Yasuoka und Oka stellten fest, dass bei frakturierten Kondylen auch der trabekuläre Knochen eine wichtige Rolle spielt (Yasuoka und Oka, 1991). Es wurde ebenfalls mittels histomorphometrischer Methoden festgestellt, dass bei der Spaltheilung mehr Knochenanteil im Frakturspalt vorhanden ist, als bei der Kontaktheilung (Uhthoff et al., 1987). Des Weiteren zeigte sich vermehrtes Wachstum des periostalen verglichen mit dem endostalen Knochen in Bezug auf den Kallus bei der Frakturheilung (West et al., 1996). Wobei sich bei dem periostalen Anteil ein zeitlich noch nicht ganz aufgeschlüsselter Wechsel zwischen Knochenaufbau und -resorption präsentierte (Aro et al., 1990).



Auch bei der Beurteilung von bioresorbierbaren Knochenklebern und deren Einfluss auf das Knochenwachstum ist die Histomorphometrie ein probates Mittel, wie einige Studien zeigten.

So wurden die Effekte von mit Knochenklebern oder -zementen beschichteten Osteosynthesematerialien auf die knöcherne Verankerung dieser Implantate untersucht (Wimhurst et al., 2001, Vasenius et al., 1990).

Auch die Wirksamkeit, speziell die Resorptions- und Barriereigenschaften, von Knochenzementen im Vergleich mit einer Kontrollgruppe wurde mittels Histomorphometrie getestet. So führte man tierexperimentelle Studien mit Poly(propylen glycol-co-fumaratsäure)zement (Lewandowski et al., 2000, Lewandowski et al., 1999A, Lewandowski et al., 1999B), Hydroxylapatitzement (Lew et al., 1997, Lykins et al., 1998) und Calciumphosphatzementen durch (Flautre et al., 1999, Ikenaga et al., 1998, Comuzzi et al., 2002, Blom et al., 2001).

Bei dem Vergleich von Fibrin-, Cyanoacrylat- und Urethanklebstoffen zeigte sich die bessere knöcherne Durchbauung des Fibrinklebers, wobei sich zwischen den beiden anderen Klebern kein großer Unterschied zeigte (Stephan et al., 1989).

Ebenfalls wurden Methacrylatkleber histomorphometrisch beurteilt. So zeigte sich bei einem porösen Methacrylatkleber im Vergleich mit zwei Hydroxylapatitzementen weniger Knochenwachstum im Frakturspalt (Donohue und Mascres, 1993). Getestet hat man auch unterschiedliche poröse Materialien, die zusammen mit Poly(2-hydroxyethyl methacrylat) eingesetzt wurden (Filmon et al., 2002).

Die Knochenhistomorphometrie ist eine vielfach genutzte, objektive, quantitative und zeitsparende Möglichkeit zur Untersuchung der Osteogenese. Sie kommt außerdem bei der Beurteilung von Knochenklebstoffen zum Einsatz.

Die Verwendung von Knochenklebern oder -zementen bietet viele Vorteile gegenüber konventionellen Osteosyntheseverfahren, wie die Vermeidung einer zweiten Operation zur Metallentfernung, weniger traumatisierende Eingriffe und das Fehlen von dauerhaft implantierten Metallen. Jedoch existieren zurzeit kaum Klebstoffe, die den enormen Ansprüchen genügen. So zeigen einige eine gute Biokompatibilität, jedoch schlechte Adhäsionskräfte. Andere besitzen diese hohen Klebekräfte, dabei fehlt ihnen aber die gute Biokompatibilität.

Ziel ist es einen Knochenkleber zu entwickeln, der alle an einen Knochenkleber gestellten Anforderungen erfüllt.

## 1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist histomorphometrisch die knöcherne Durchbauung im Osteotomiespalt der Femurkondyle des Kaninchens nach Applikation von zwei Knochenklebervarianten im Vergleich zur Kontrollgruppe zu untersuchen.

Mit der Knochenhistomorphometrie liegt eine besonders objektive Methode zur Untersuchung von Knochenwachstum und -struktur vor. Hierbei soll untersucht werden, ob die beiden Klebervarianten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe eine Barriere für die Osteogenese bilden. Außerdem werden die beiden Klebervarianten miteinander verglichen.

Die nachfolgenden Fragen sind im Detail mit der vorliegenden Arbeit zu analysieren:

Besteht ein histomorphometrisch messbarer Unterschied der Frakturheilung zwischen den beiden Klebervarianten und der Kontrollgruppe?

Können Unterschiede des knöchernen Wachstums (Osteogenese) in verschiedenen Zonen des Osteotomiespalts festgestellt werden? Besonderes Augenmerk liegt dabei im Vergleich des Kondylenbereichs (gelenknaher Bereich) mit dem Markraum (gelenkferner Bereich).

Gibt es Unterschiede der Osteogenese in ventralen und zentralen Längsschnitten des Femurs?

Bestehen Unterschiede in der Osteogenese nach 21 und nach 42 Tagen?

Ziel dieser Arbeit ist somit den Einfluss zweier Knochenklebervarianten auf die Osteogenese im Osteotomiespalt der Femurkondyle des Kaninchens, sowie die Durchbauung des Osteotomiespaltes in unterschiedlichen Zonen mit Hilfe der Histomorphometrie zu untersuchen.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Versuchstiere**

Für diese Arbeit wurde als Versuchstier das Kaninchen gewählt, da dieses in der Haltung nicht sehr anspruchsvoll und widerstandsfähig ist, besonders im Hinblick auf die Operation. Außerdem lassen sich an diesem Kleintiermodell die Vorgänge der Knochenbruchheilung gut darstellen. Die Frakturheilung verläuft hier in ähnlicher Weise wie beim Menschen, nur wesentlich schneller. So sind die meisten Vorgänge der Heilung schon nach 6 Wochen abgeschlossen (Wissing et al., 1990).

Die Versuche wurden an Tieren der Rasse ZiKa vorgenommen. ZiKa bedeutet „Zimmermann-Kaninchen“ und ist eine vom Züchter selbst gezüchtete Rasse. Vergleichbar sind diese Tiere in Größe und Gewicht mit der Rasse "Deutscher Riese". Gerade auch wegen der besonders überproportionalen Größe und deren Gewicht im Vergleich zu anderen Kaninchen wurden diese Tiere ausgewählt.

Die Versuche erfolgten erst nach einer ausreichenden Eingewöhnungszeit der Tiere an ihre Umgebung. Im weiteren Versuchsverlauf wurden die Tiere im Tierstall der Firma BIOMET MERCK Biomaterials, Darmstadt, Deutschland untergebracht. Die Tiere wurden in Gruppen auf Stroh gehalten, damit sie genügend Bewegung hatten und die Beine entsprechend belastet waren. Bei der täglichen Fütterung wurde auf das Allgemeinverhalten geachtet. Zusätzlich wurden an den im Protokoll eingetragenen Terminen die Tiere einzeln von einem Veterinärmediziner nachuntersucht. Hierbei wurde insbesondere der Heilungsverlauf an der Operationswunde beobachtet und dokumentiert.

Die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes (§ 8 Abs. 1 in der Fassung vom 18.8.1986, BGB1.I.S. 1319 mit Änderung des Artikels 3 vom 20.8.1990), nach Genehmigung des Tierversuches im August 2000 durch die Tierschutzkommission, wurden strikt eingehalten. Die Tiere wurden mit Wasser und standardüblichem Trockenfutter ad libitum ernährt.

### **2.2 Versuchsprotokoll**

Bei dieser Arbeit fanden 48 Kaninchen Verwendung, die in drei Gruppen aufgeteilt wurden. Hierbei erfolgte jeweils eine standardisierte Osteotomie an der lateralen Femurkondyle. Die Fixation der Femurkondylen unterschied sich in den drei Gruppen

(Tab. 1). Die erste Gruppe bestand aus 12 Tieren und stellte die Kontrollgruppe dar. Hier erfolgte die Fixation mit zwei Kirschnerdrähten. Bei der zweiten Gruppe wurden ebenfalls zwei Kirschnerdrähte zur Fixation eingesetzt, jedoch zusätzlich die Knochenklebervariante 1 appliziert. In dieser Gruppe befanden sich 24 Tiere. Die erste und zweite Gruppe stellten die erste Serie dar und wurden im September 2000 operiert. Die dritte Gruppe bestand aus 12 Tieren, denen die Knochenklebervariante 2 appliziert wurde. Außerdem erfolgte die Fixation mit Hilfe eines Kirschnerdrahtes und einer kanülierten Spongiosazugschraube (Firma SYNTHES, Umkirch, Deutschland). Diese Gruppe stellte im Dezember 2000 die zweite Serie dar, wobei man auf die Kontrollgruppe verzichtete, da schon in der ersten Serie eine Kontrollgruppe angelegt wurde. Der Einsatz der Schraube in der zweiten Serie erfolgte, um eine höhere Kompression auf den Osteotomiespalt auszuüben und so eine bessere Heilung zu erzielen.

Die Tiere wurden in der ersten Serie nach 7, 21, 42 und 84 Tagen euthanasiert, in der zweiten Serie nach 21 und 42 Tagen.

Um für die Versuchs- und Kontrolltiere den statistischen Regeln entsprechend gleichmäßige Ausgangssituationen zu schaffen, wurde die Randomisierung in Kleber- und Kontrollgruppen, sowie rechte oder linke hintere Extremität erst nach Beendigung der Osteotomie intraoperativ vorgenommen. Vor Beginn der Versuchsreihe war eine Randomisierungsliste erstellt worden. Die jeweilige Zuordnung bestimmte das Losverfahren.

Gruppe	Euthanasie nach OP (Tage)	Anzahl (n)	Gesamt (n)
Kontrollgruppe (1. Serie)	7	3	12
	21	3	
	42	3	
	84	3	
Knochenklebervariante 1 (1. Serie)	7	6	24
	21	6	
	42	6	
	84	6	
Knochenklebervariante 2 (2. Serie)	21	6	12
	42	6	

Tab. 1: Versuchsprotokoll – Gruppeneinteilung.

## 2.3 Operationstechnik

Um auf die Humanmedizin übertragbare Verhältnisse zu gewährleisten, war es notwendig, ein Fraktur- bzw. Osteotomiemodell zu erstellen, welches in seiner Aussagekraft der operativen Versorgung und den ablaufenden biologischen Formations- und Resorptionsvorgängen des Knochens (Osteogenese) dem des Menschen bei monokondylären Femurfrakturen gleichzusetzen war. Da beim Menschen in Anlehnung an die 3 Typen der monokondylären Femurfraktur die laterale am häufigsten auftritt und sich dieses ausgewählte Frakturmodell als erprobt und etabliert zeigt, wurde die laterale Femurkondyle der Kaninchen abgesetzt (Ostermann et al., 1994, Wissing et al., 1990).

Nach Freipräparation und Blutstillung erfolgte die Markierung der Osteotomie durch einen Kirschnerdraht (1 mm) lateral im Bereich der Knorpel-Knochengrenze, um als Zielpunkt für die Sägerichtung zu dienen (Abb. 5a). Das Sägeblatt der oszillierenden Säge (Firma SYNTHES, Umkirch, Deutschland) wurde zentral in der Interkondylarregion angesetzt (Abb. 5b). Als Orientierungspunkt diente hier der knöcherne Ansatz des vorderen Kreuzbandes. Auf den die Knorpel-Knochengrenze

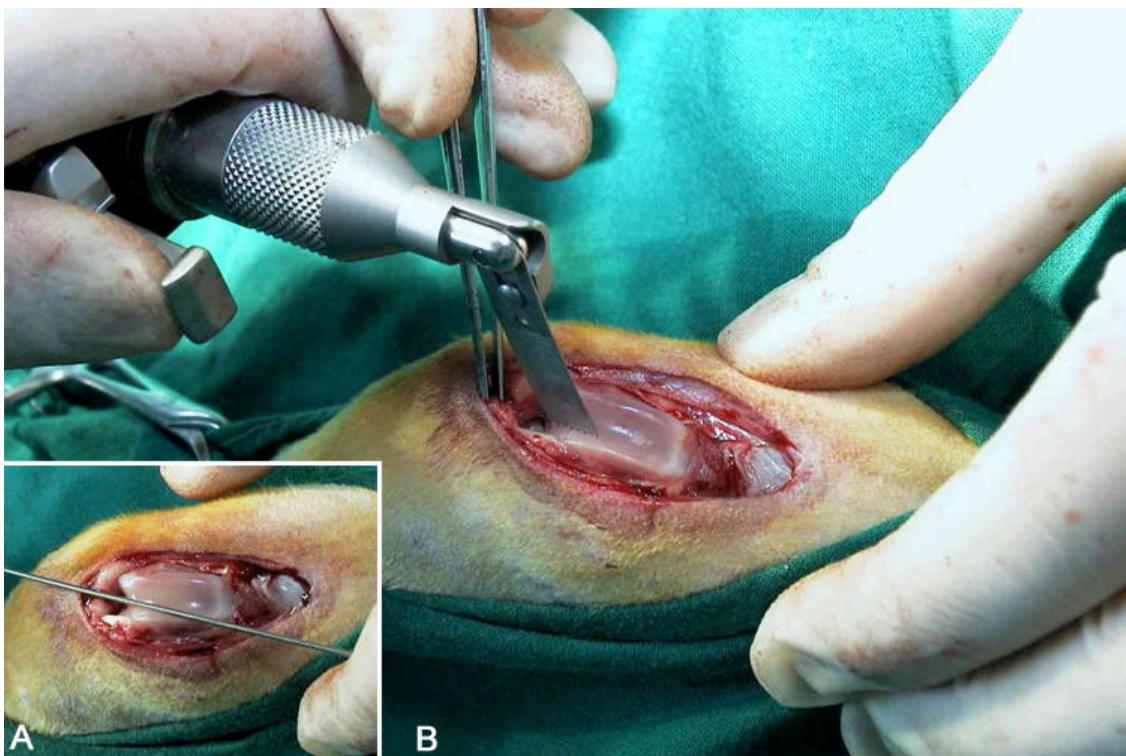


Abb. 5: A - Markierung der Osteotomie-richtung durch K-Draht.  
B - Osteotomie mit oszillierender Säge (Separation der lateralen Femurkondyle).

markierenden Kirschnerdraht zielend wurde die laterale Femurkondyle, unter andauernder Kühlung mit physiologischer Kochsalzlösung (NaCl) sowie Schonung des Weichteilgewebes und der Bandstrukturen, abgesetzt (Abb. 5a+b).

Im Anschluß daran erfolgte bei den beiden Klebergruppen die Applikation des Knochenklebers in den Osteotomiespalt (Abb. 6a). Bei der Kontrollgruppe fiel dieser Schritt aus. Anschließend wurde die laterale Femurkondyle wieder reponiert (Abb. 6b).

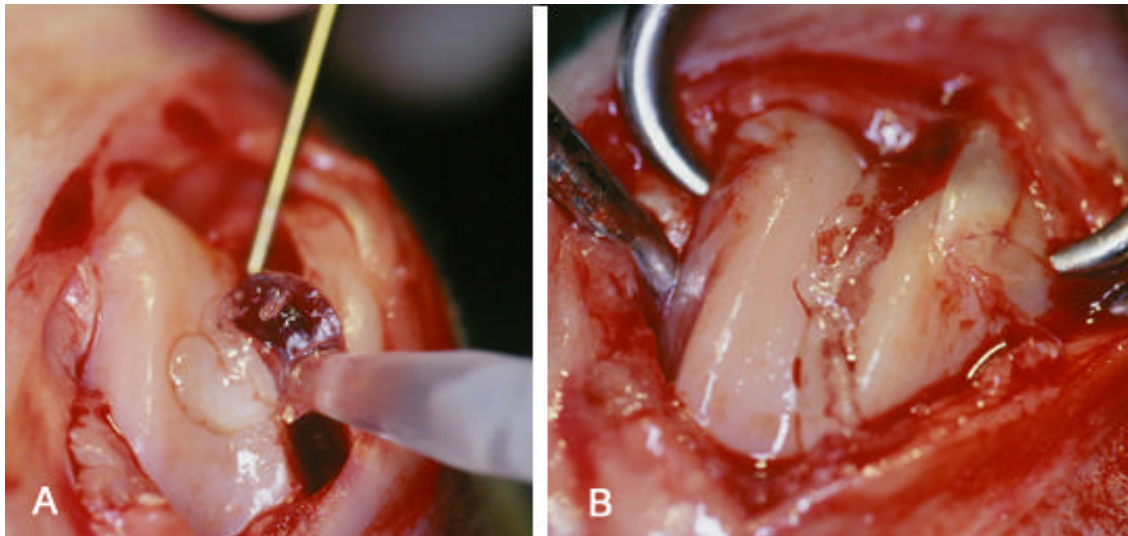


Abb. 6: A - Kleberapplikation in den Osteotomiespalt. B - Anatomische Reposition der lateralen Femurkondyle mit einer spitzen Repositionsklemme (Fixationsphase).

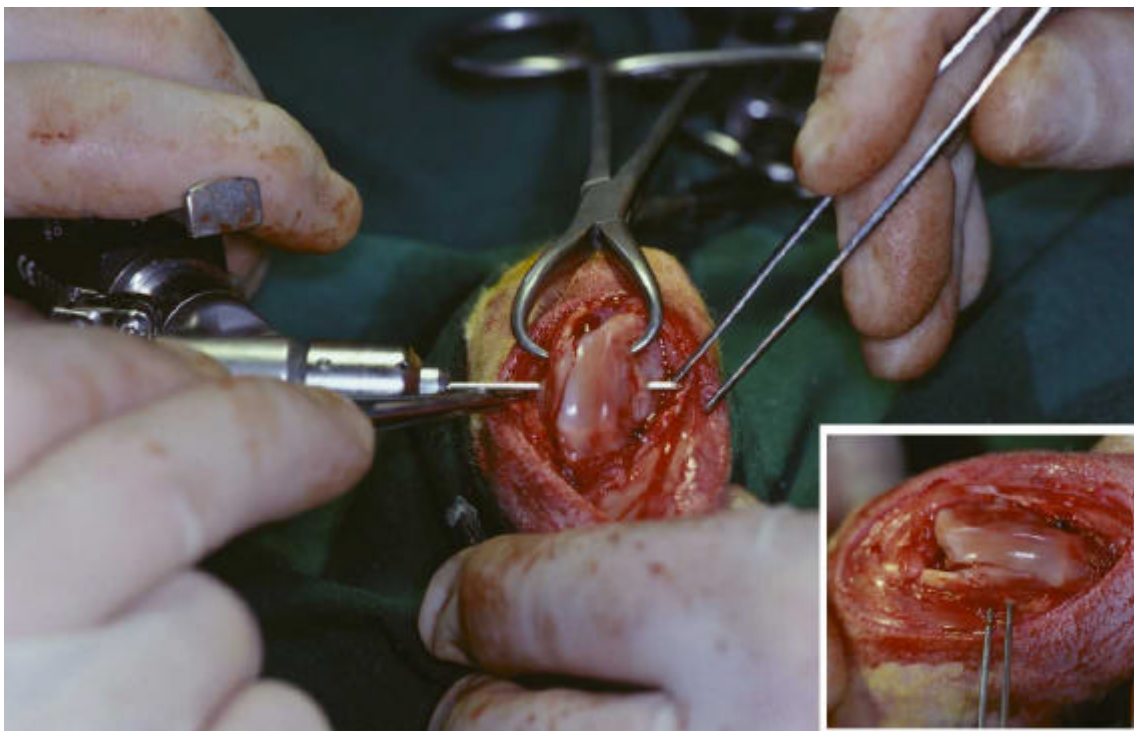


Abb. 7: Fixation der lateralen Femurkondyle durch zwei 1 mm starke, parallel eingebrachte Kirschner-Drähte aus Titan (senkrecht zur anatomischen Achse) (Serie 1).



Bei der Kontrollgruppe und der Klebervariante 1 wurde die laterale Femurkondyle mit Hilfe zweier Titan-Kirschner-Drähte fixiert (Abb. 7). Bei der Klebervariante 2 erfolgte die Fixation mit nur einem Titan-Kirschner-Draht und zusätzlich einer 3,5 mm kanülierten Titan-Schraube mit kurzem Gewinde (Firma SYNTHES, Umkirch, Deutschland) um eine höhere Kompression auf den Osteotomiespalt auszuüben (Abb. 8).

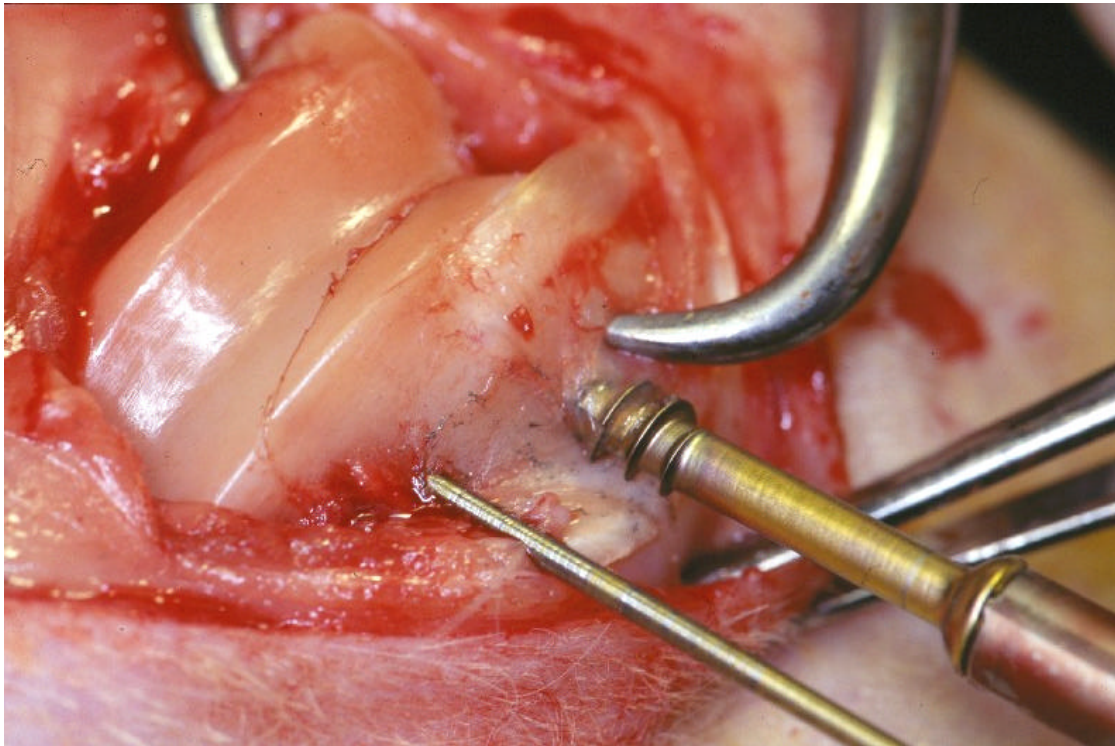


Abb. 8: Einbringen einer 3,5 mm kanülierten Titan-Schraube (Zugschraube) mit kurzem Gewinde über Führungsdraht (Serie 2).

Im Anschluß an die Operation wurden die Tiere täglich kontrolliert. Besonders die Operationswunde wurde hinsichtlich Wundheilung, Serombildung und Infektion in Augenschein genommen.

Nach 21 beziehungsweise 42 Tagen erfolgte die Euthanasie mit Hilfe einer intravenösen Injektion von 5,0 ml T61<sup>®</sup> (Hoechst AG, Frankfurt/Main, Deutschland). Anschließend wurde der operierte Hinterlauf im Hüftgelenk exartikuliert und das Femur proximal der Femurkondyle halbiert. Die Femurkondyle wurde präpariert und in 70 %igem Alkohol fixiert.

Nach Eintreffen der fixierten Knochenproben im "Labor für experimentelle Unfallchirurgie" der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie, Justus-Liebig Universität Gießen (Kerkraderstr. 9, 35394 Gießen; Leiter: Univ.- Prof. Dr. Dr. Schnettler), folgte die feinsäuberliche Entfernung des am Knochen verbliebenen Weichteilgewebes und der Bandstrukturen.

## **2.4 Probenbearbeitung durch die Trenn-Dünnschliff-Technik**

Die Trenn-Dünnschliff-Technik nach DONATH ist eine Methode zur Erstellung von Schliffen mit Stärken bis 10  $\mu\text{m}$  (Donath und Breuner, 1982). Dies gilt insbesondere für Gewebe und Präparate, die nicht mit einem Mikrotom schneidbar sind, wie in diesem Falle die Kaninchenknochen mit K-Drähten und Schrauben. Durch die Trenn-Dünnschliff-Technik kann man auch mit diesen Geweben histologische, mikroradiographische, fluoreszenzmikroskopische und eben histomorphometrische Untersuchungen durchführen.

Die Herstellung aller Schnitte und Färbungen erfolgte im "Labor für experimentelle Unfallchirurgie" (Kerkraderstr. 9, 35394 Gießen; Leiter: Univ.- Prof. Dr. Dr. Schnettler), der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie, Justus-Liebig Universität Gießen.

### **2.4.1 Vorbereitung der Knochenpräparate für die Fixation**

Nach Euthanasie der Kaninchen wurde den Tieren die Femura (Kondyle + Diaphysenschaft) entnommen, nummeriert und in 70 % Alkohol fixiert. Nach dem Transport in das "Labor für experimentelle Unfallchirurgie" wurde die Knochenprobe freipräpariert, d.h. Muskelreste und Reste der Kniegelenkscapsel und -bänder wurden entfernt. Bei allen Präparaten wurde die Diaphyse kurz nach dem Übergang von der Kondyle zur Diaphyse mit der Trenneinheit der Firma EXAKT abgetrennt. Da die zu bearbeiteten Präparate eine sehr große Dimension aufwiesen, wurden sie insgesamt 21 Tage zum Entwässern in der aufsteigenden Alkoholreihe belassen. Während der gesamten Zeit befanden sich die Proben auf einem Labormagnetrührer.



Somit ergaben sich folgende Einbettzeiten:

70 %	Alkohol	3 Tage		
80 %	Alkohol	3 Tage	→	Alkohol wechseln
80 %	Alkohol	3 Tage		
96 %	Alkohol	3 Tage		
100 %	Alkohol	3 Tage	→	Alkohol wechseln
100 %	Alkohol	3 Tage	→	Alkohol wechseln
100 %	Alkohol	3 Tage		
<hr/>				
Gesamt: 21 Tage				

#### 2.4.2 Infiltration

Die ersten drei Stufen der Kunststoffinfiltration wurden mit einem Gemisch aus reinem Alkohol und Technovit 7200<sup>®</sup> VLC (Firma KULZER, Friedrichsdorf, Deutschland) in aufsteigendem Technovitverhältnis durchgeführt. Bei der Technovit 7200<sup>®</sup> VLC-Infiltrationslösung handelt es sich um einen lichthärtenden Einkomponentenkunststoff auf Methacrylatbasis. Ab der ersten Infiltrationsstufe befanden sich die Proben in:

30 % Technovit – 70 % Alkohol	3 Tage
50 % Technovit – 50 % Alkohol	3 Tage
70 % Technovit – 30 % Alkohol	3 Tage
<hr/>	
Gesamt: 9 Tage	

Die nachfolgende Infiltration erfolgte in reinem Technovit. Hierbei wurde für jede einzelne Stufe ein Zeitraum von 5 Tagen gewählt, um eine optimale Durchdringung des gesamten Knochens mit Technovit zu gewährleisten. Zusätzlich wurde bei den reinen Technovitstufen mit einer Vakuumpumpe gearbeitet, die in 15 minütigen Intervallen zwischen Normdruck und Unterdruck wechselt. Die drei reinen Technovitstufen unterschieden sich nur in der aufsteigenden Qualität des Technovits. Stufe I war durch den Alkohol aus den vorhergehenden Technovit-Alkohol Stufen am meisten verunreinigt.

100 % Technovit (I)		5 Tage
100 % Technovit (II)	+ Dibenzoylperoxid (BPO)	5 Tage
100 % Technovit (III)	+ Dibenzoylperoxid (BPO)	5 Tage
		Gesamt: 15 Tage

### 2.4.3 Einbettung und Polymerisation

Die mit Technovit infiltrierten Präparate wurden in kleine Plastikschälchen, die sogenannten „Einbettmulden“ gelegt und komplett mit dem Einbettkunststoff bedeckt. Das Plastikschälchen wurde in eine Kammer des Einbettgerätes gesetzt.

Die Polymerisation erfolgte durch Exposition der Proben im Lampenlicht (Wellenlänge 400-500 nm). Hierbei wurden zwei Stufen unterschieden:

1. Vorpolymerisieren mit Gelblicht zur langsamen Einleitung der Polymerisation und zur Vermeidung von Spannungsrissen für 2 Stunden.
2. Endgültige Polymerisation mit Blaulicht für 4 Stunden.

Der gesamte Vorgang erfolgte automatisch durch das wassergekühlte Kulzer-EXAKT Lichtpolymerisationsgerät bei einer Polymerisationstemperatur von weniger als 40°C.

### 2.4.4 Einteilung der Schnittebenen

Die Einteilung der Femurkondyle erfolgte in neun Längsschnitte und zwei Querschnitte (Abb. 9). Zusätzlich zu den Längsschnitten erfolgte die Entnahme eines Knochenblockes zwischen der dritten und vierten sowie der sechsten und siebten Schnittebene. Die Querschnitte und die Knochenblöcke wurden für die raster-elektronenmikroskopischen und microcomputertomographischen Untersuchungen in einer anderen Dissertationsarbeit (Hahn, in Vorbereitung) verwendet, mit der Fragestellung der Biokompatibilität und Degradation der Klebervarianten.

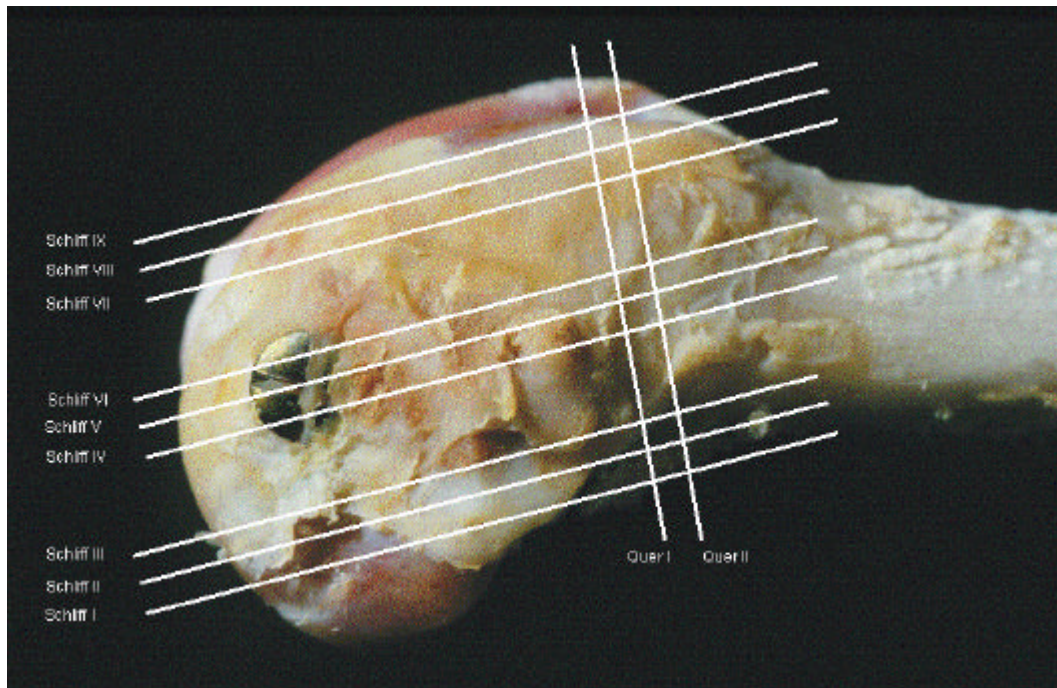


Abb. 9: Einteilung der Schnittebenen - 9 Längsschnitte (I-IX), 2 Querschnitte (Quer I-II).

#### 2.4.5 Herstellung eines Dünnschliffes

Wie in Abb. 10 sichtbar wurde der eingebettete Knochen nun im Verhältnis 2:1 geteilt.

- *2/3 Kondylenregion*
- *1/3 Übergang zur Diaphyse*

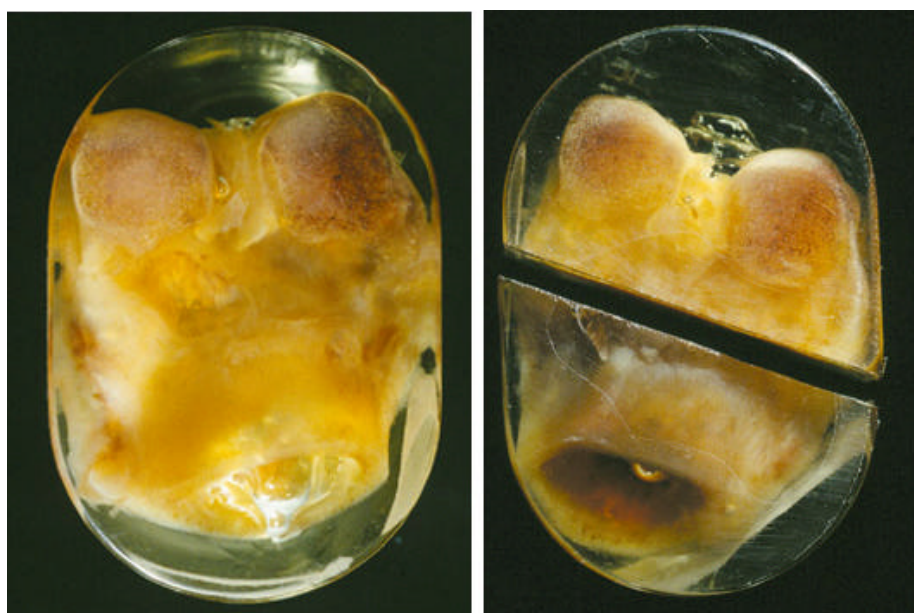


Abb. 10: Auspolymerisierte TECHNOVIT Knochenblöcke.

Aus dem vorderen Block (Kondylenregion) wurden die Längsschnitte, aus dem hinteren die beiden Querschnitte erstellt. Nach dem Teilen des Blockes wurden beide Teile mit Technovit® 4000 (Firma KULZER, Friedrichsdorf, Deutschland) auf einen angerauten Objektträger geklebt und zwar auf die Seite des Kunststoffblockes, die der zu untersuchenden Seite gegenüberlag. Hierfür wurde eine Präzisionsklebepresse der Firma EXAKT verwendet.

Das Mikroschleifsystem besteht aus einem Grundgerät mit einem rotierenden Schleifteller für Sandpapierscheiben (Nassschleifpapier: Körnung 600 und 1200, sowie Silikonkarbid). Oberhalb des Schleiftellers befindet sich ein Block, der auf zwei Metallachsen durch eine Gewindespindel linear bewegt werden kann. Dieser Block enthält die Vakuumplatte zur Aufnahme eines Objektträgers und gibt Kühlflüssigkeit ab. Die Andruckkraft des Blockes auf den rotierenden Schleifteller wird durch unterschiedliche Gewichte bestimmt.

Nun wurde mit dem EXAKT Mikroschleifsystem der auf dem Objektträger befestigte Block so angeschliffen, dass die zu untersuchende Frakturzone sichtbar wurde und Planparallelität zum Objektträger vorlag. Die Planparallelität wurde anschließend durch eine Mehrpunktdickenmessung kontrolliert und dokumentiert.

Die Oberfläche des Blockes wurde nun mit Waschbenzin gereinigt und eine dünne Schicht Technovit 7210® aufgetragen. Mit Hilfe der Präzisionsklebepresse wurde nun ein 2. Objektträger (bekannter Dicke) planparallel aufgebracht. Es folgte die erneute Messung der Präparatedicke mittels einer Mikrometerschraube und die Berechnung der Kleberdicke aus den zuvor gemessenen Einzeldicken.

Der 1. Objektträger wurde auf der Vakuumplatte des Trennsystems befestigt. Ein 160 µm dicker Schnitt wurde am 2. Objektträger abgetrennt. Das Trennschleifgerät arbeitet nach dem Prinzip einer Bandsäge (Abb. 11). Die Laufgeschwindigkeit des Sägebandes ist stufenlos einstellbar und zur Vermeidung von Wärmeentwicklung ist eine Kühlvorrichtung vorhanden, die das Sägeblatt ständig kühlt. Die Trennbänder bestehen aus einem 200 µm dicken Stahlband, welches mit Diamantkörnern beschichtet ist. Die Körnung richtet sich nach dem zu schneidenden Material.

Benutzt wurde ein Trennband mit der Körnung D 64. Die Dicke des Schnittes errechnet sich aus der Gesamtdicke des Präparates abzüglich der vorher gemessenen Objektträger- und Kleberstärke. Der auf den Objektträger aufgeklebte Schnitt wurde dann mit dem EXAKT-Mikroschleifsystem auf die gewünschte Dicke heruntergeschliffen. Es wurden Schliffdicken zwischen 15-25 µm erzielt.

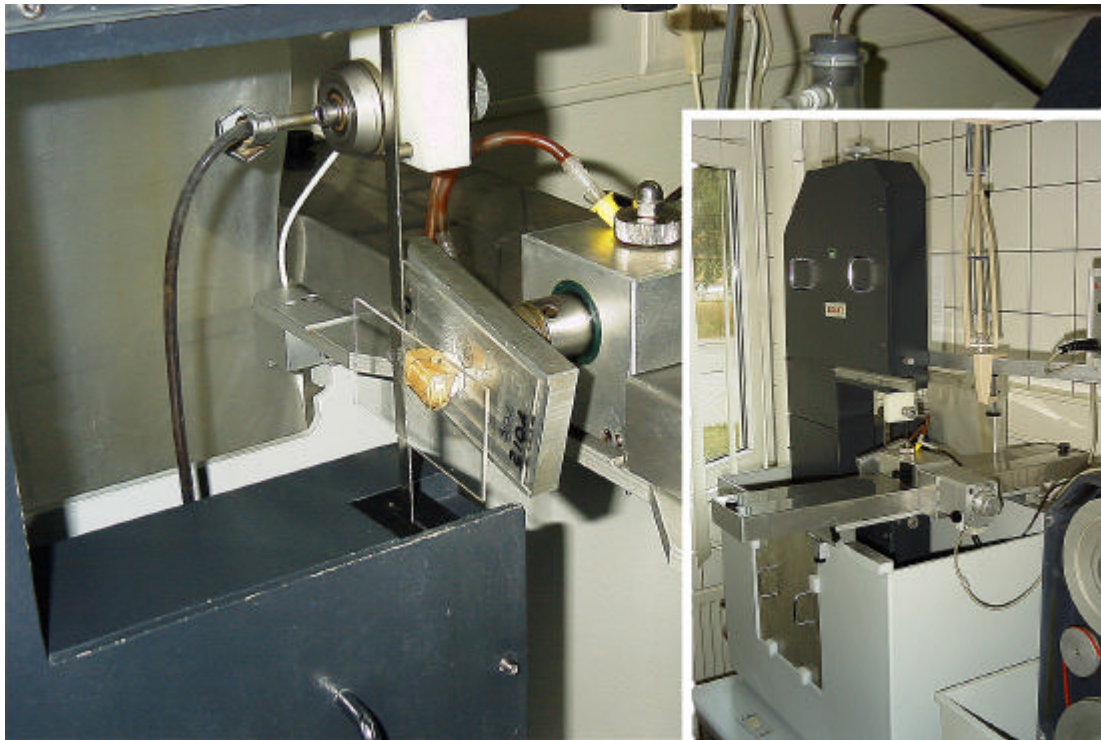


Abb. 11: Trennsystem mit eingespanntem Knochenblock.

Anschließend folgte ein Polieren mit Silikonkarbidpapier, um Schleifspuren zu beseitigen. Aus dem vorderen distalen Teil wurden neun Schnitte in Längsrichtung erstellt (Abb. 9).

Die einzelnen Arbeitsschritte sahen hier wie folgt aus:

1. Querschleifen der Oberfläche bis die Frakturzone sichtbar war
2. Schliff I, II, III → 1. Ebene
3. Absägen einer ca. 2-3 mm dicken Scheibe für Micro-CT Analysen
4. Schliff IV, V, VI → 2. Ebene
5. Wenn der Knochen es von der Dicke erlaubte 2. Scheibe für Micro-CT Analysen
6. Schliff VII, VIII, IX → 3. Ebene  
(bei dünnen Knochen war teilweise VIII und IX nicht mehr möglich)

In Abb. 9 und 10 ist sichtbar, dass der auspolymerisierte Block geteilt wurde. Im letzten Arbeitsschritt wurden aus dem proximal zur Diaphyse übergehenden Anteil die beiden Querschnitte entnommen.

### 2.4.6 Färbetechniken der unentkalkten Knochenschliffe

Je ein Längsschliff aus allen drei Ebenen wurde mit Toluidinblau und einer nach Levai-Laczko für die Auswertung gefärbt. Für einzelne Längsschliffe wurde außerdem die van Gieson-Bindegewebsfärbung verwendet.

#### *Toluidinblau-Färbung:*

1. Schliff abwischen mit Aceton-Alkohol (1:1)
2. 15 Minuten einlegen in 10 %  $\text{H}_2\text{O}_2$
3. Abspülen mit Leitungswasser
4. 15 Minuten färben in Toluidinblau
5. Abspülen in Leitungswasser
6. Schliff trocknen und differenzieren mit Aceton-Alkohol. Kurz abwischen!
7. Eindecken mit Deckglas

#### *Levai-Laczko:*

1. Schliff abwischen mit Aceton-Alkohol (1:1)
2. 15 Minuten einlegen in 10 %  $\text{H}_2\text{O}_2$
3. Abspülen in Leitungswasser
4. Lösung "A" (doppelt filtrieren) 20 Minuten
5. Abspülen in Leitungswasser
6. Pararosanilin 15 Sekunden
7. Abspülen in Leitungswasser
8. Schliff trocknen und differenzieren mit Aceton-Alkohol. Kurz abwischen!
9. Eindecken mit Deckglas

Lösung "A" besteht aus:

1 Teil Azur II, 1 Teil Methylenblau und 2 Teile  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (1 %)

#### *Van Gieson-Bindegewebsfärbung:*

1. Abwischen des Schliffs mit Aceton-Alkohol (1:1)
2. 15 Min. färben in Weigerts Eisenhaematoxylin
3. 5 Min. in fließendem Leitungswasser wässern
4. 4 Min. färben in van Gieson-Gemisch (Pikrofuchsin)

5. Abspülen in Leitungswasser
6. Abtrocknen
7. Eindecken mit Deckglas

Herstellung des van Gieson-Gemisches:

100 ml filtrierte, gesättigte, wässrige Pikrinsäurelösung + 10 ml 1 %ige Säurefuchsinlösung

## **2.5 Knochenkleber**

### **2.5.1 Chemische Zusammensetzung**

Ausgangspunkt für die Entwicklung eines degradierbaren Polymers für das Kleben von Knochenfragmenten waren Adhäsivsysteme auf der Basis von Alkylen-bis(oligolactoyl)methacrylaten. Die Monomere werden dabei aus einem Diol (z.B. Ethylenglykol), einer Hydroxycarbonsäure (z.B. Milchsäure, eingesetzt in Form von Lactid) und Methacrylsäure (MAS) aufgebaut (Abb. 12). Das Monomer Ethylenglykol-oligolactid-dimethacrylat (ELAMA) wird hieraus in zwei Syntheseschritten erhalten und kann in seiner Struktur durch Variationen der Alkoholkomponente und der Hydroxycarbonsäure modifiziert werden. Synthesebedingt erhalten die Monomere 1 Masse-% Methacrylsäure (MAS) als hydrophiles Comonomer.

Für die durchgeführten Kleinterversuche (Serie 1 und 2) wurden zur Einstellung der Aushärte- und Abbaueigenschaften (Abbaugeschwindigkeit) verschiedene weitere Comonomere dem oben beschriebenen Hauptmonomeren zugesetzt.

Als Comonomer können verwendet werden:

- Methacrylsäure (MAS)
- Methylmethacrylat (MMA)
- Cyclohexylmethacrylat (CHMA)
- Hydroxyethylmethacrylat (HEMA)
- Hydroxyethylmethacrylat-oligolactid (HEMALA)



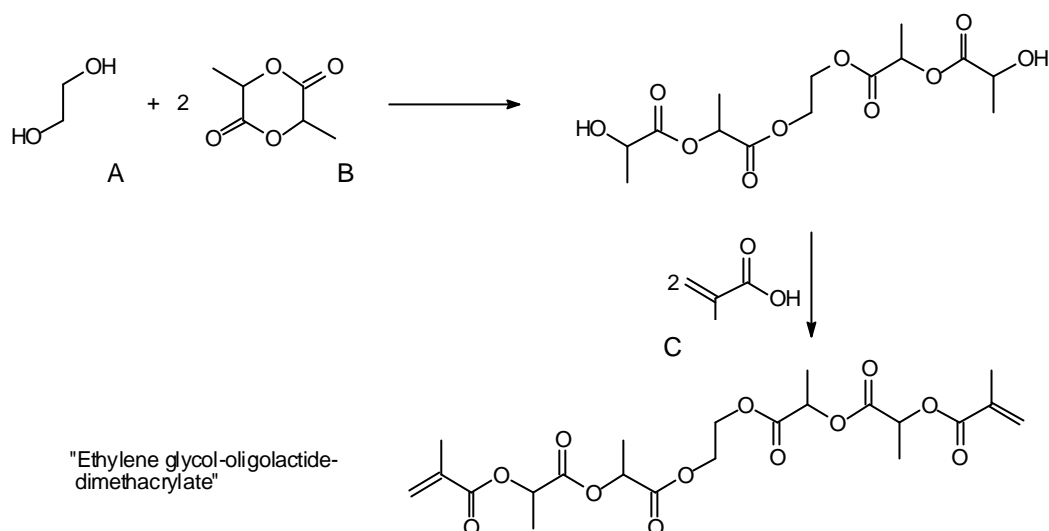


Abb. 12: Zweistufige Synthese von Ethylenglycol-oligolactid-dimethacrylat (ELAMA), ausgehend von Ethylenglykol (A), Lactid/Milchsäure (B) und Methacrylsäure (C).

Da sich bei den Operationen der ersten Serie im September 2000 herausstellte, dass das verwendete Material für eine gute Applikation zu dünnflüssig war, wurde für die zweite Serie im Dezember 2000 ein Comonomer mit einer höheren Viskosität verwendet. Hierzu wurde MMA durch HEMALA-1,3 (3 Mol Lactid, d.h. 6 Milchsäureeinheiten pro Hydroxylethylmethacrylat) ersetzt. Alle weiteren Inhaltsstoffe blieben unverändert. Zusätzlich zu 1 Masse-% Methacrylsäure enthielten die verwendeten Abmischungen somit folgende weiteren Verbindungen (Abb. 13):

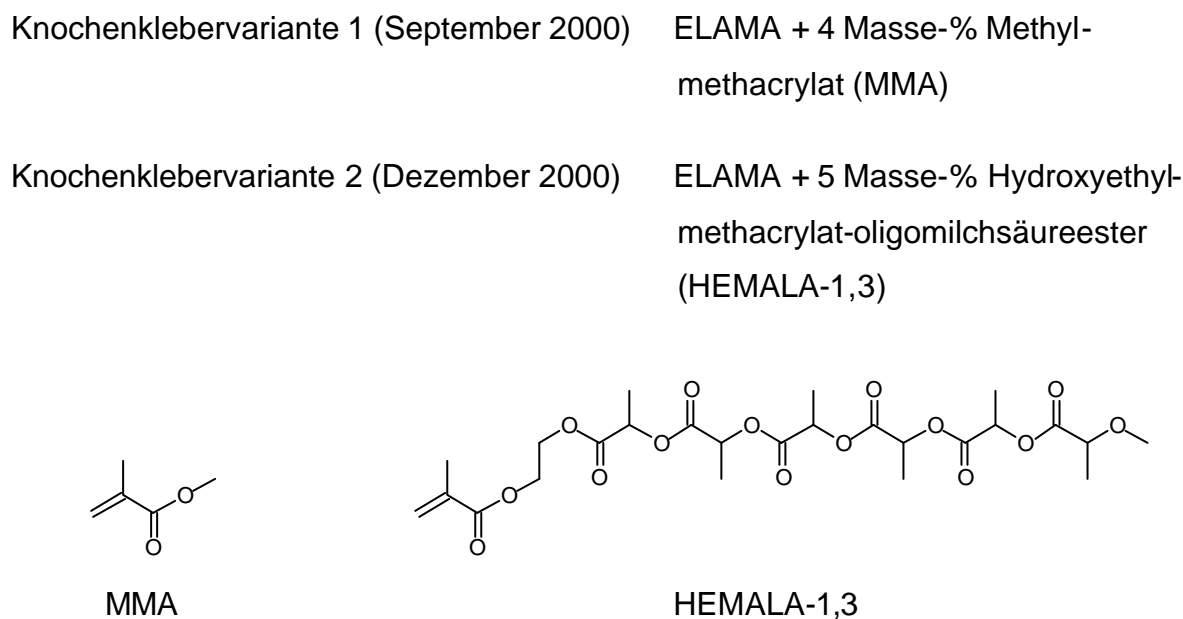


Abb. 13: Die Comonomere der Knochenklebervariante 1: MMA und der Knochenklebervariante 2: HEMALA-1,3.



In allen Versuchen diente eine 3 Masse-%ige Lösung von 9-Borabicyclononan (9-BBN) gelöst in einem Träger von Polyethylenglycol-400 (PEG-400) als Starterkomponente.

Als Polymerisationsbeschleuniger enthielten alle Monormischungen 2 Masse-% tert.-Butylperoxybenzoat. Starterträgerkomponente und Monomer (ELAMA + Comonomer) wurden im Verhältnis 1:10 durch ein 2-Kammermischsystem mit einem aufgesetzten Statikmischer appliziert.

Der aus dem Statikmischer kommende Knochenkleber wies eine pastöse Konsistenz auf und beginnt nach ca. 1 Minute auszuhärten. Nach 5 Minuten war die mechanische Festigkeit erreicht und nach 24 Stunden war das Polymer komplett ausgehärtet.

Das ausgehärtete Polymer bestand dabei aus ca. 65 Masse-% Milchsäure, zu 25 Masse-% aus wasserlöslichen Polymethacrylsäuren und zu 10 Masse-% aus Ethylenglycol (Abb. 14).

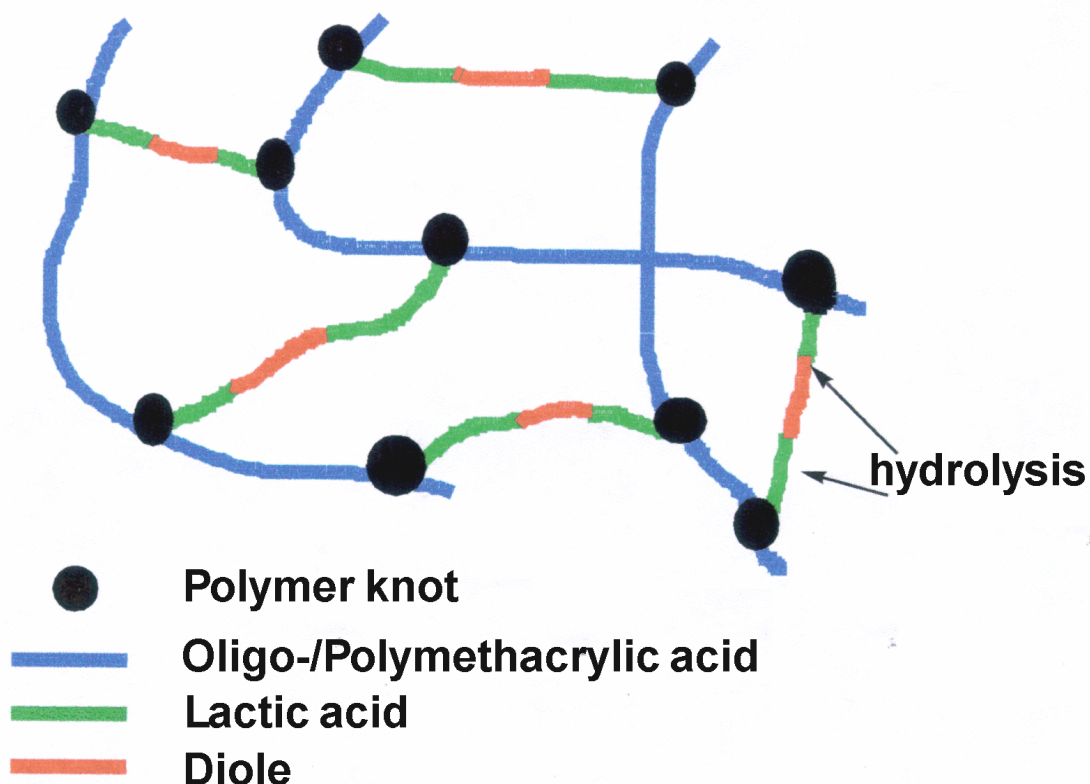


Abb. 14: Polymeres Netzwerk des Knochenklebers.

### 2.5.2 Degradation

Der Abbau des polymeren Klebernetzwerkes beginnt mit der Hydrolyse der Ester-Verbindungen. Es entstehen Ethylenglykol, Milchsäure und Oligomere/Polymere der Methacrylsäure. Ethylenglykol und Milchsäure sind Metabolite des menschlichen Stoffwechsels. Sie fließen in den "Zitronensäurezyklus" ein, werden verstoffwechselt und verlassen den Körper als Kohlendioxid und Wasser. Die verbleibenden Oligomere/Polymere der Methacrylsäure, welche hoch wasserlöslich sind, können vom Körper über die Niere ausgeschieden werden. Voraussetzung hierfür ist ein Molekulargewicht kleiner 8000 g/mol. Bei den Methacrylatoligomeren im Kleber kann davon ausgegangen werden, dass sie durch stereometrische Hemmung während der Polymerisation dieses Molekulargewicht nicht erreichen.

Die Abbaugeschwindigkeit der beiden Knochenklebervarianten wurde *in vitro* an ausgehärteten Knochenkleberzylindern in Soerensen Puffer (pH = 7,4) bei 37°C nach ISO 15814 (Implants for surgery - Copolymers and based on polylactide - In vitro degradation testing) gemessen. Dabei zeigte sich, dass durch Hydrolyse die Zylinder nach 30 Wochen abgebaut waren (Heiss et al., 2004).

## 2.6 Histomorphometrische Auswertung

Um eine möglichst objektive und quantitative Analyse der Frakturheilung beim Kaninchen vorzunehmen, kommt bei der vorliegenden Arbeit die Knochenhistomorphometrie zum Einsatz. Hiermit ist eine weitestgehend untersucherunabhängige Beurteilung der knöchernen Bestandteile des Osteotomiespaltes möglich. Es sollen die in der Einleitung näher erläuterten Parameter TBV, S<sup>v</sup>, S/V, MTPT, MTPD, MTPS und Marrow Space Star Volume bestimmt werden. Damit können Aussagen hinsichtlich der trabekulären Vernetzung und des Volumens des Knochens getroffen werden.

Zur histomorphometrischen Auswertung konnten nicht alle vorhandenen Knochenschliffpräparate verwendet werden (Tab. 2). Bei den nach 7 Tagen euthanisierten Tieren war keinerlei Knochenwachstum im Osteotomiespalt feststellbar, so dass eine histomorphometrische Analyse keinen Sinn gemacht hätte (Abb. 15). Ebenso konnten die 84-Tage Tiere nicht verwendet werden, da sich hier

kein Osteotomiespalt mehr klar abgrenzen ließ und somit der Auswertungsbereich nicht genau festzulegen war (Abb. 16). Aber auch bei den 21- und 42-Tage Tieren fielen einzelne Präparate heraus, da der Osteotomiespalt hier zu schmal war, um einen Auswertungsbereich festzusetzen (Abb. 17).

	Beobachtungstag	Anzahl Tiere (n)
Kontrollgruppe	21	3
	42	3
Kleber- variante 1	21	4
	42	6
Kleber- variante 2	21	3
	42	3

Tab. 2: Anzahl der ausgewerteten Tiere pro Versuchsgruppe.

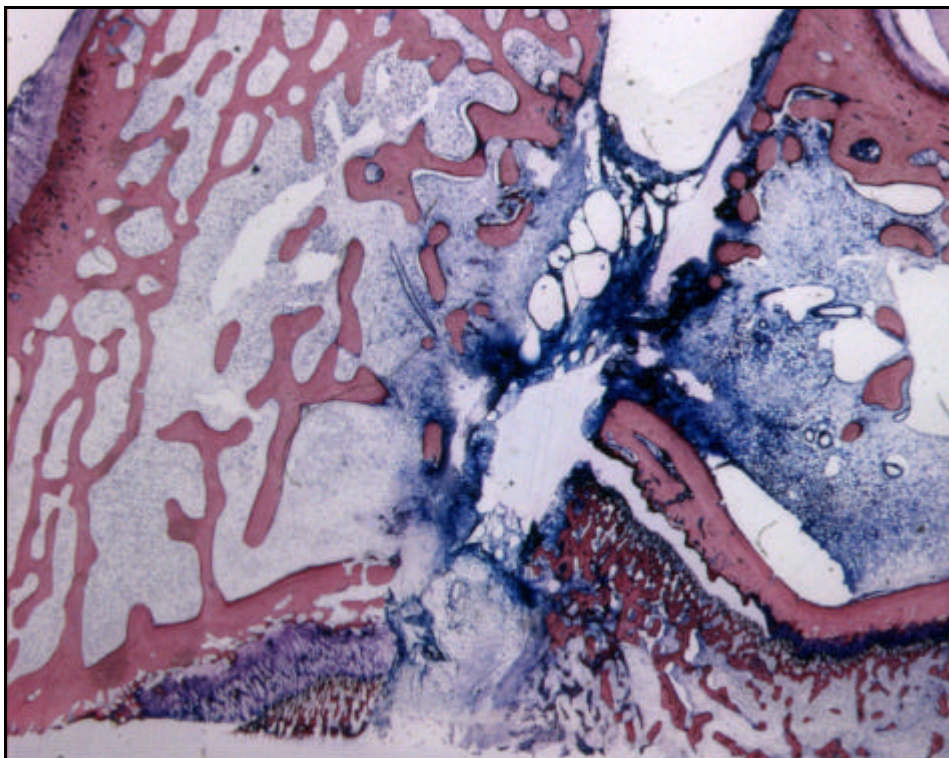


Abb. 15: 7-Tage Präparat der Klebergruppe ohne knöchernes Wachstum im Frakturspalt.

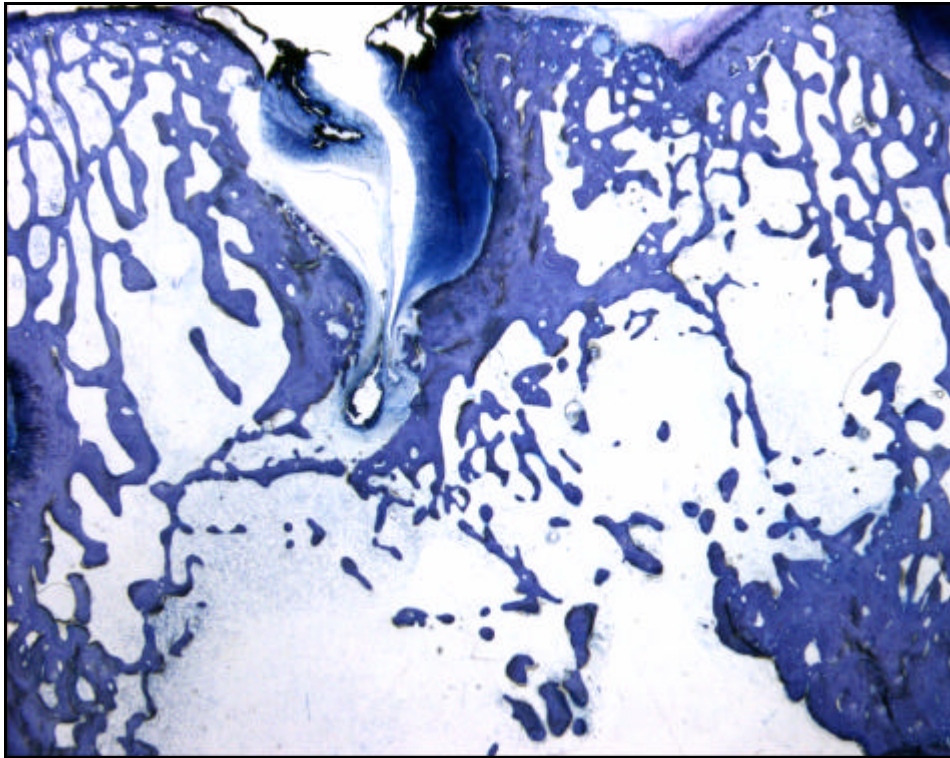


Abb. 16: 84-Tage Präparat der Klebervariante 1 mit kompletter Durchbauung des Frakturspaltes.

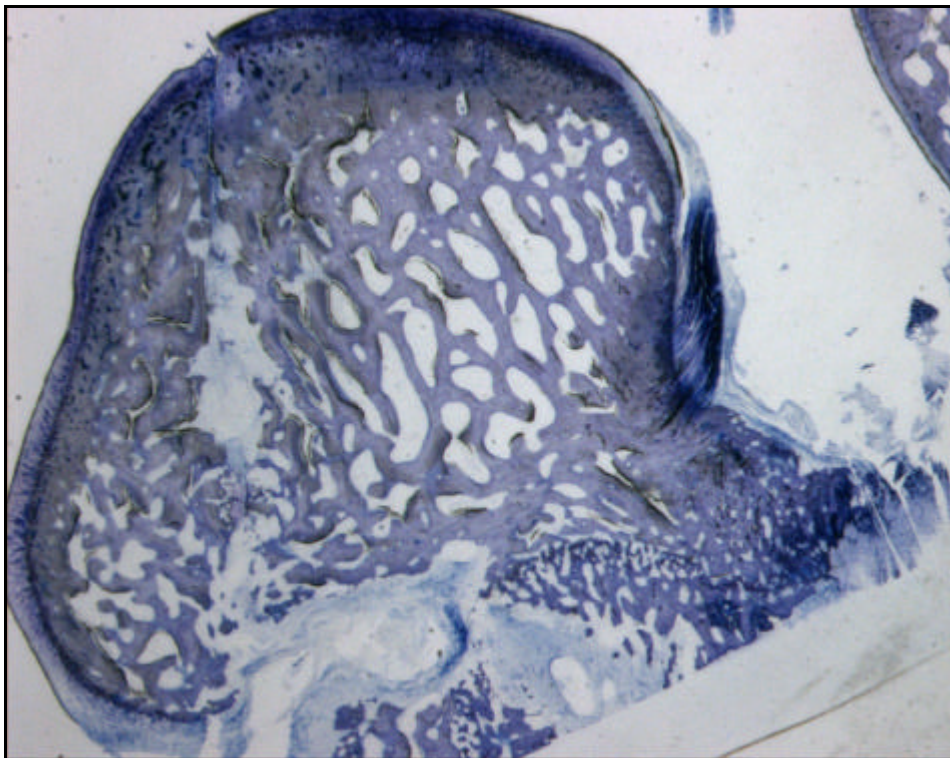


Abb. 17: 21-Tage Präparat der Kontrollgruppe mit zu schmalem Frakturspalt für die Auswertung.



Von jedem Tier fanden jeweils zwei Längsschnitte des Femurs Verwendung (Abb. 9).

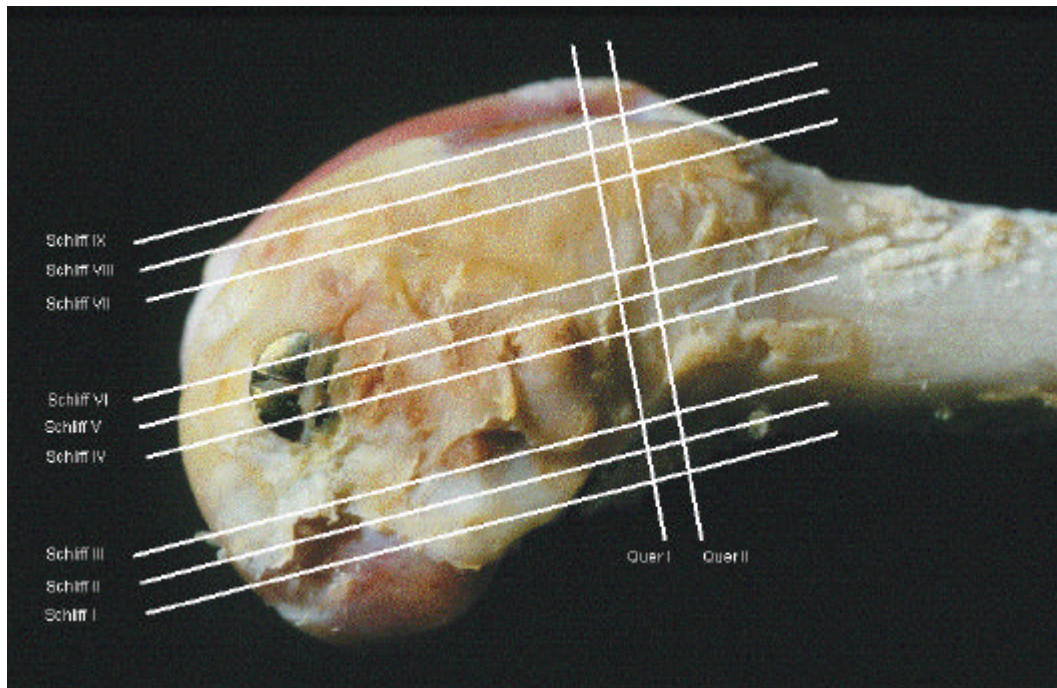


Abb. 9: Einteilung der Schnittebenen - 9 Längsschnitte (I-IX), 2 Querschnitte (Quer I-II).

Es wurde jeweils ein Schnitt aus der zentralen (1.Schnitt: Schliffe 4-6) und einer aus der ventralen (2.Schnitt: Schliffe 7-9) Ebene verwendet. Aus der dorsalen Ebene waren nicht genügend Schliffe vorhanden, um auf eine statistisch verwertbare Anzahl zu kommen.

Die histomorphometrischen Untersuchungen erfolgten im "Labor für experimentelle Unfallchirurgie" (Kerkraderstr. 9, 35394 Gießen; Leiter: Univ.- Prof. Dr. Dr. Schnettler), der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie, Justus-Liebig Universität Gießen.

Zur histomorphometrischen Auswertung der Präparate kam das computerunterstützte Bildanalysesystem KS400® (Firma Carl Zeiss, Jena, Deutschland) zur Anwendung (Abb. 18). Dieses Bildverarbeitungssystem verfügt über eine hohe Anzahl von Mess- und Analysefunktionen. Es können geometrische Objektmerkmale wie Flächen, Umfänge oder Formen, aber auch densitometrische Informationen wie mittlerer Grauwert oder optische Dichte bestimmt werden. So ist es, je nach Programmierung des Systems, nicht nur möglich knöcherne Präparate zu



Abb. 18: Computerunterstütztes Bildanalysesystem KS400® (Firma Carl Zeiss, Jena, Deutschland) im Labor für experimentelle Unfallchirurgie.

untersuchen, sondern z.B. auch Gefäßwandstärken, Zellanzahl oder Zellkerne. Vorteil des Systems ist es, dass der eigentliche Bildanalysevorgang, bei dem die histomorphometrischen Parameter ermittelt werden, voll automatisiert abläuft und untersucherunabhängig ist. Dies bedeutet einen erheblichen Zeitgewinn bei gleichzeitig guter Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Jedoch unterliegt der Bildbearbeitungsprozess, bei dem Kontrast, Helligkeit und Bildschärfe eingestellt werden, in vielen Teilen dem Untersucher. Dabei ist jedoch eine Fehlerminimierung durch ein und denselben Untersucher zu erreichen.

Das Programm wurde speziell programmiert um die histomorphometrischen Parameter des Knochens zu ermitteln. Damit ist es nun möglich die knöchernen Anteile aufgrund ihrer unterschiedlichen Anfärbung, Kontrastierung und Helligkeit voneinander zu diskriminieren. Das Programm kann so entweder direkt oder indirekt die weiter oben genannten histomorphometrischen Parameter messen. Ebenso ist es dem Programm möglich von den gemessenen zweidimensionalen Werten auf dreidimensionale Parameter zu schließen.

Damit die computerunterstützte Auswertung möglich wurde, mussten die gefärbten histologischen Präparate mit einem Stereomikroskop Stemi SV 11® (Firma Carl Zeiss, Jena, Deutschland) und einer CCD-Videokamera XC-007P (Firma Sony,

Tokyo, Japan) aufgenommen und in die Computereinheit mit dem Bildanalyseprogramm übertragen werden. Im Computer erfolgte dann die Digitalisierung der Bilddaten in ein binäres Schwarz-Weiß-Bild.

Auf einem Mikroskoptisch erfolgte die Fixierung der Objektträger mit den Präparaten, so dass ein gleichmäßiges Abfahren des Frakturspaltes mit dem Mikroskop möglich war.

Um den Frakturspalt später zur Auswertung in einer verwendbaren Größe und Auflösung vorliegen zu haben, wurden die Präparate mit einer 44-fachen Vergrößerung eingelesen. Bei dieser Vergrößerung konnte jeweils nicht das gesamte Präparat auf einmal eingelesen werden, sondern es waren zwischen 7-20 Einzelbilder notwendig (Abb. 19). Dabei wurde ein Startpunkt innerhalb des Präparats festgelegt von dem aus der Osteotomiespalt durch Bewegen des Mikroskopiertisches abgefahren wurde. Die Einzelbilder wurden später von dem Computerprogramm wieder zu einem Gesamtbild zusammengesetzt, an dem die Analyse vorgenommen werden konnte.

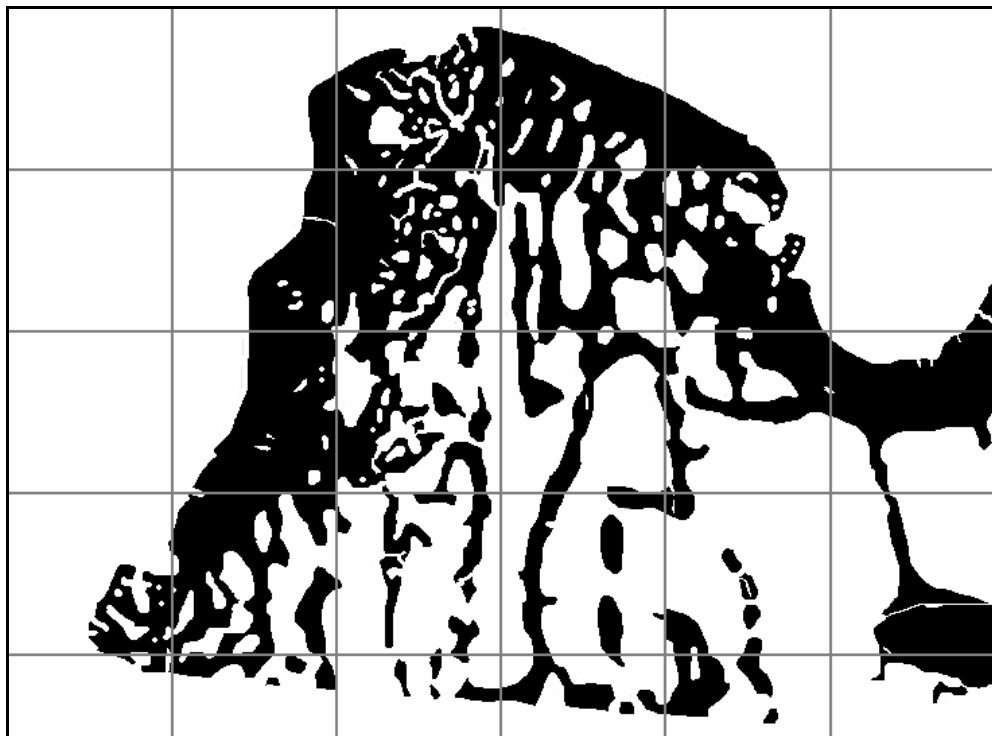


Abb. 19: Aus Einzelbildern zusammengesetztes 42-Tage Präparat aus der Kontrollgruppe.

Nach dem Einlesen der Präparate wurden die Einzelbilder interaktiv im Vergleich mit dem lichtmikroskopischen Originalbild am Bildschirm nachbearbeitet. Es konnten so Artefakte, wie Luftblasen oder zurückgebliebenes Bindegewebe, entfernt und der

Kontrast der oftmals schwach gefärbten Präparate mit Hilfe des Programms verstärkt werden.

Bei der eigentlichen Auswertung mit Hilfe der Histomorphometrie erfolgte zunächst die Ausrichtung des in den Computer eingelesenen Präparates anhand des Osteotomiespalt. Der jeweilige Messbereich in dem Osteotomiespalt wurde dann mit einem in der Größe beliebig einzustellenden Rechteck festgelegt. Dieses Auswertungsrechteck wurde in den kompletten Osteotomiespalt eingelegt und dessen Länge mit Hilfe eines Koordinatensystems ermittelt. Bei Einbringen des Rechtecks in den Spalt musste darauf geachtet werden, dass kein schon vor der Osteotomie vorhandener originärer Knochen, neben den neu gebildeten knöchernen Anteilen, in den Auswertungsbereich mit aufgenommen wurde. Hierzu erfolgte wiederum die lichtmikroskopische Kontrolle am Originalpräparat, bei dem die Differenzierung des neuen vom ursprünglichen Knochen durch unterschiedlich starke Anfärbung möglich war (Abb. 20).

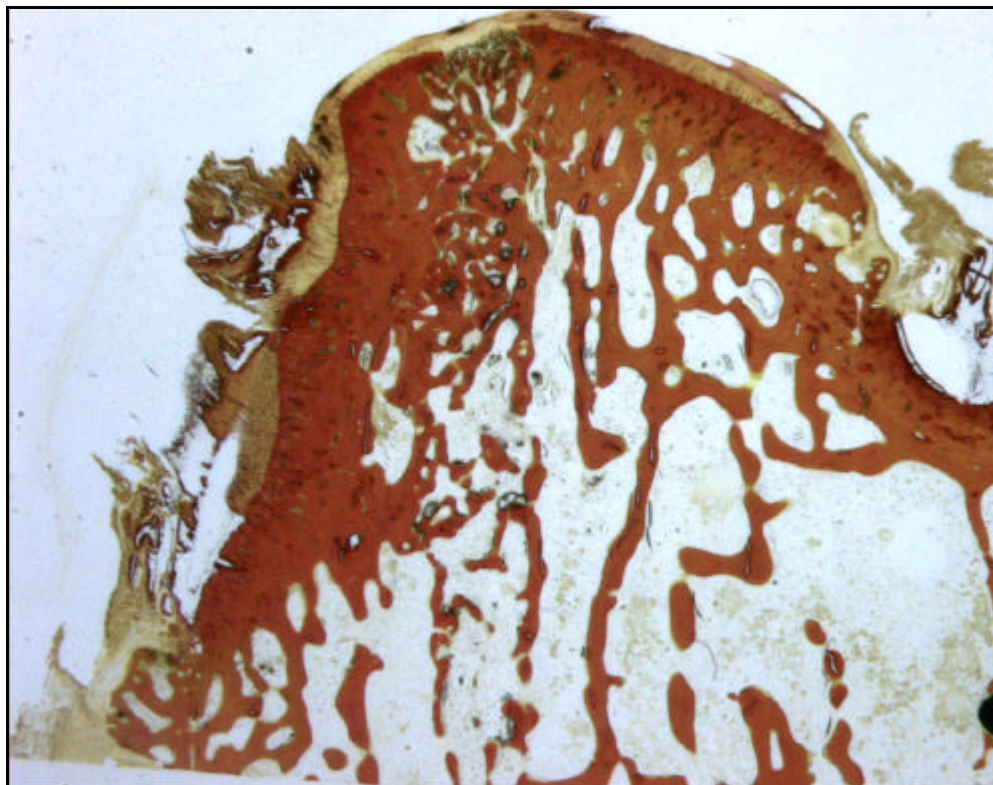


Abb. 20: Nach van Gieson gefärbtes Originalpräparat eines 42-Tage Präparates der Kontrollgruppe zur lichtmikroskopischen Kontrolle der Nachbearbeitung und der korrekten Einlage der Messfeldquadranten.



Der jeweilige Osteotomiespalt wurde mittels Koordinatensystem in drei gleich große Quadranten (Felder) eingeteilt in denen die Auswertung vorgenommen wurde, einen gelenknahen kondylenwärts gerichteten Quadranten (1), einen zentralen (2) und einen im gelenkfernen Markraum (3) (Abb. 21).

Oftmals schlossen die kondylenwärts gerichteten, gelenknahen Osteotomiespaltenden nicht parallel ab, was für die Festlegung des Messfeldquadranten problematisch war. Hier wurde der Auswertungsbereich nur bis zu dem Punkt gezogen an dem noch an beiden Seiten des Osteotomiespalts eine seitliche Begrenzung durch originären Knochen bestand (Abb. 21).

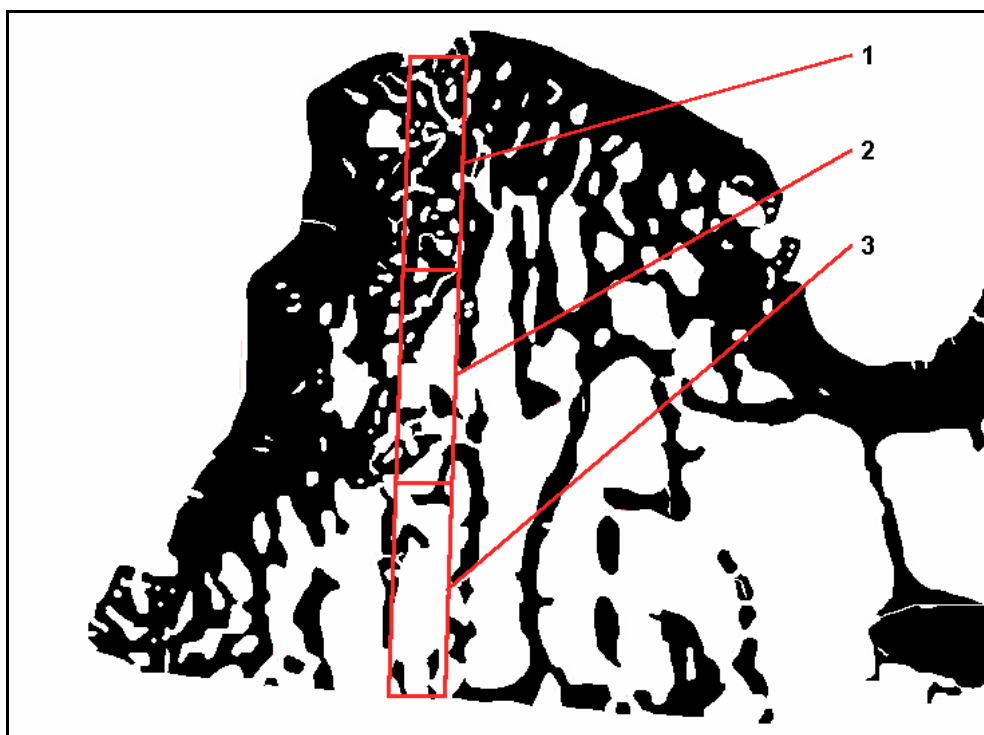


Abb. 21: Einteilung der Messfeldquadranten bei einem 42-Tage Präparat der Kontrollgruppe.

Bei Vorhandensein eines Kirschnerdrahtes im Präparat wurde der jeweilige Quadrant, in dem sich der Draht befand, so verkleinert, dass nur knöcherne Bereiche in die Auswertung einfließen (Abb. 22). Da die Messwerte jeweils prozentual berechnet oder in Relation zur Fläche bestimmt wurden, gab es hier kaum Fehlbestimmungen.

Wenn, wie in der Abbildung 22, ein Messfeldquadrant durch den Kirschnerdraht geteilt wurde, so wurden zu beiden Seiten des Kirschnerdrahtes die Anteile des Quadranten jeweils für sich gemessen. Anschließend wurde aus den Ergebnissen

der beiden Anteile der Mittelwert berechnet. Dieser Mittelwert ging dann auch in die statistische Auswertung mit ein.

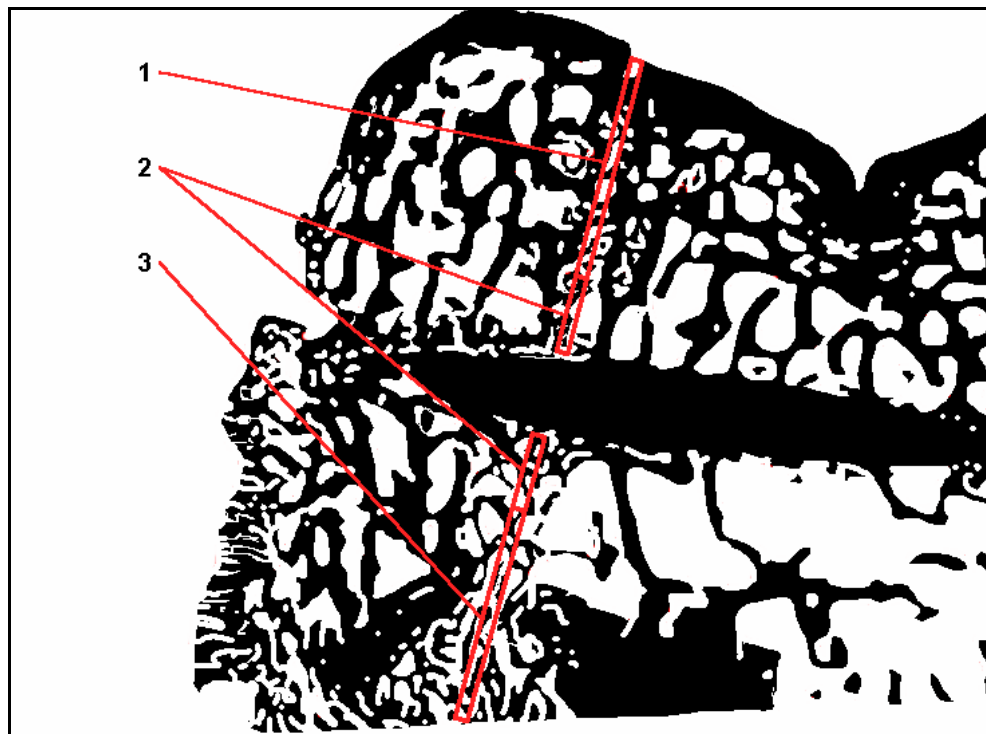


Abb. 22: Einteilung der Messfeldquadranten bei Anwesenheit eines Kirschner-Drahtes in einem 21-Tage Präparat der Kontrollgruppe.

## 2.7 Statistik

Die histomorphometrisch erhobenen Daten wurden zur weiteren Analyse in dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Firma Microsoft, Seattle, USA) gespeichert. Die weitere statistische Datenauswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS für Windows 11.5 (Firma SPSS Software GmbH, München, Deutschland).

Die Datenanalyse wurde mittels der mehrfaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholung durchgeführt. Mit der Varianzanalyse wird, ähnlich wie beim  $t$  Test für unabhängige Stichproben, die Hypothese geprüft, nach der die Mittelwerte einer Variablen in verschiedenen Gruppen in der Grundgesamtheit gleich groß sind. Im Unterschied zum  $t$ Test kann man mit der Varianzanalyse jedoch auch mehr als zwei verschiedene Gruppen auf Mittelwertunterschiede hin vergleichen. Es ist möglich nicht nur eine, sondern mehrere nominalskalierte, unabhängige Variablen

auf ihre Einflüsse bezogen auf die metrische, abhängige Variable zu überprüfen. In letzterem Fall spricht man von mehrfaktorieller Varianzanalyse.

Die Varianzanalyse ist an ähnliche Voraussetzungen gebunden wie der t-Test. So muss es sich um eine Zufallsstichprobe aus einer normalverteilten Grundgesamtheit handeln. Im Unterschied zum t-Test müssen die Stichproben immer unabhängig sein.

Hierbei wurden Signifikanzniveaus von

$p > 0,05$  als nicht signifikant

$p < 0,05$  als signifikant \*

$p < 0,01$  als hoch signifikant bezeichnet. \*\*

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 21- und 42-Tage Kontroll- und Klebgruppen

Zunächst wurde das TBV (Trabecular Bone Volume) der Kontroll- und der beiden Klebgruppen nach 21 und 42 Tagen miteinander verglichen. Mit diesem Parameter soll die Knochendichte, also der Knochenvolumenanteil in Bezug auf das Gewebenvolumen, analysiert werden. Es ist der maßgeblichste Parameter bei der Knochenhistomorphometrie.

Bei dem direkten Vergleich der 21- mit der 42-Tage Gruppe zeigte sich bei der Klebvariante 1 nach 21 Tagen mit einem Wert von 36,68% ein 1,4fach höherer Wert als nach 42 Tagen mit 26,44%, wobei kein signifikanter Unterschied feststellbar war ( $p=0,199$ ) (Abb. 23). Die Unterschiede bei der Klebvariante 2 waren ebenfalls nicht signifikant ( $p=0,89$ ). Die Mittelwerte waren nach beiden Tagen fast identisch. Nach 21 Tagen betrug der Wert 21,76%, nach 42 Tagen 24,22%.

Innerhalb der Kontrollgruppe ergaben sich ebenso keine signifikanten Unterschiede ( $p=0,941$ ), wobei die Mittelwerte auch kaum differierten. So zeigte sich nach 21 Tagen ein durchschnittlicher Wert von 34,56%, nach 42 Tagen einer von 34,10%.

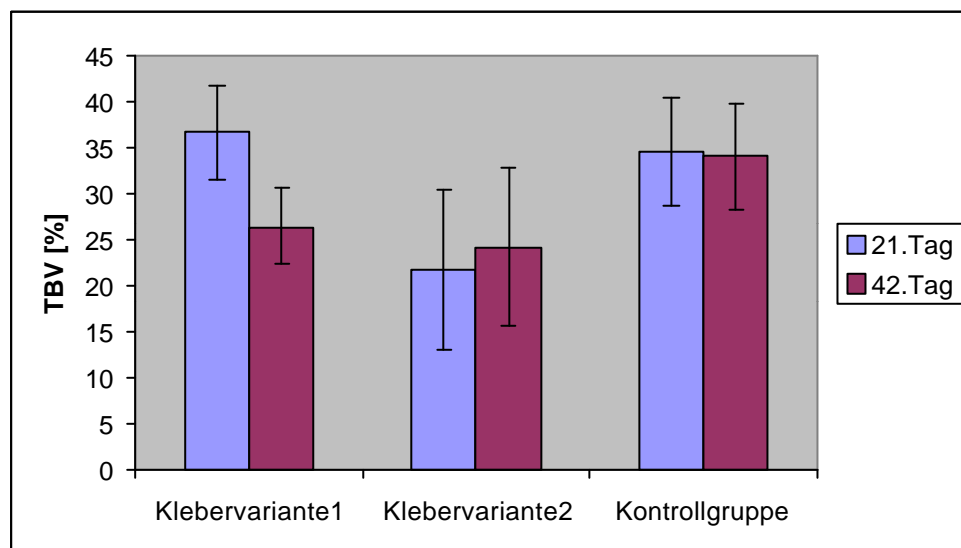


Abb. 23: TBV der 21- und 42-Tage Kontroll- und Klebgruppen.

Es folgte der Vergleich für den Parameter  $S^*v$  (Oberflächendichte), welcher eine Aussage über die Oberflächendichte des Knochens, also der Grenzfläche der Spongiosa mit dem Markraum, erlaubt.

Hierbei zeigte sich bei der Klebervariante 1 ein signifikant höherer Wert nach 21 Tagen im Vergleich mit den Ergebnissen nach 42 Tagen ( $p=0,013$ ) (Abb. 24). Mit  $4,34 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$  lag dieser nach 21 Tagen außerdem mehr als doppelt so hoch, wie nach 42 Tagen mit  $1,97 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$ .

Mehr als 1,4fach höher lag der Mittelwert für die 21-Tage Gruppe im Vergleich mit den Ergebnissen nach 42 Tagen bei der Klebervariante 2. Doch konnten diese nicht als signifikant bezeichnet werden ( $p=0,5$ ). Dabei lag der Wert nach 21 Tagen bei  $3,03 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$ , nach 42 Tagen bei  $2,11 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$ .

Als hoch signifikant konnten die Unterschiede in der Kontrollgruppe bezeichnet werden ( $p=0,007$ ). Dabei waren die Ergebnisse mit  $4,62 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$  in der 21-Tage Gruppe ungefähr doppelt so hoch wie nach 42 Tagen mit  $2,61 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$ .

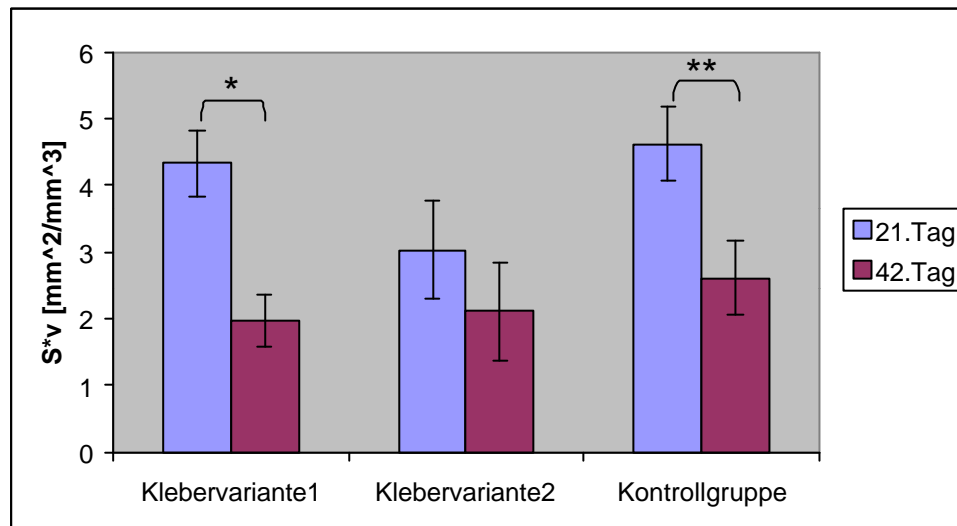


Abb. 24:  $S^*v$  der 21- und 42-Tage Kontroll- und Klebergruppen.

Als nächster Parameter wurde  $S/V$ , die spezifische Trabekeloberfläche, untersucht. Dieser Wert gibt Auskunft über die Porosität des Knochens.

Hierbei ließ sich bei der Klebervariante 1 ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Tagen nachweisen ( $p=0,022$ ) (Abb. 25). So war ein ca. 1,4fach höherer Mittelwert von  $12,86 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$  nach 21 Tagen feststellbar, im Vergleich mit dem Ergebnis von  $8,94 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$  nach 42 Tagen.

Für die Klebervariante 2 konnte keine signifikante Differenz der beiden Tage ermittelt werden ( $p=0,31$ ). Dabei war ein deutlicher Unterschied vorhanden. Mit einem Wert von  $24,43 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$  lag die 21-Tage Gruppe ungefähr 1,6mal über der 42-Tage Gruppe mit  $15,33 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$ .

Fast doppelt so hoch waren die Ergebnisse nach 21 Tagen bei der Kontrollgruppe im Vergleich mit der 42-Tage Gruppe. Dieser Unterschied konnte auch als signifikant bezeichnet werden ( $p=0,03$ ). Nach 21 Tagen betrug der Mittelwert  $14,86\text{mm}^2/\text{mm}^3$ , nach 42 Tagen  $8,14\text{mm}^2/\text{mm}^3$ .

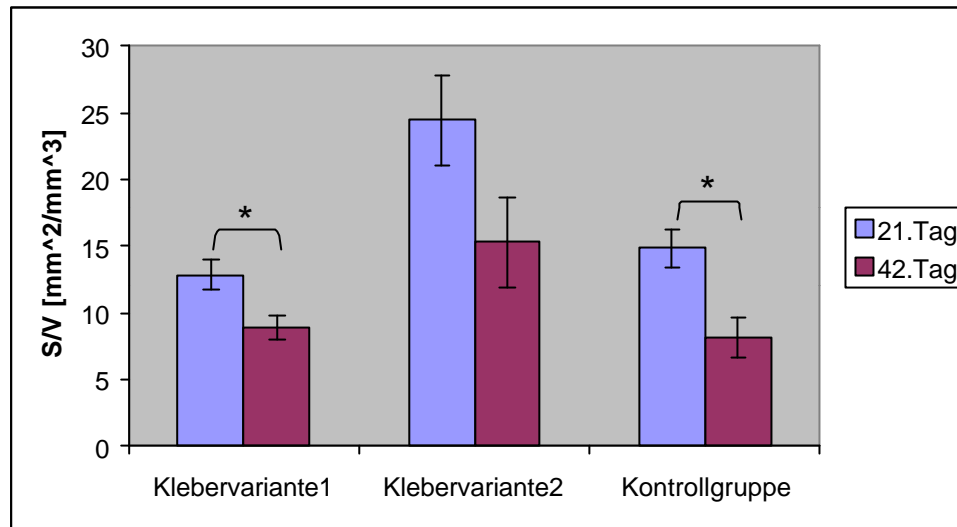


Abb. 25: S/V der 21- und 42-Tage Kontroll- und Klebergruppen.

Um Informationen über die Verteilung des trabekulären Knochens zu bekommen, wurde der Parameter MTPT (mittlere trabekuläre Dicke) untersucht.

Bei der Klebervariante 1 war der Unterschied zwischen dem 21. und 42. Tag hoch signifikant ( $p=0,001$ ) (Abb. 26). So zeigte sich nach 42 Tagen mit  $247,89\text{ }\mu\text{m}$  ein 1,5fach höherer Wert im Vergleich zu  $166,31\text{ }\mu\text{m}$  nach 21 Tagen.

Fast 1,6mal höhere Werte nach 42 Tagen zeigten sich bei der Klebervariante 2. So betrug der Mittelwert in der 42-Tage Gruppe  $190,82\text{ }\mu\text{m}$  und in der 21-Tage Gruppe  $119,30\text{ }\mu\text{m}$ . Jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant ( $p=0,23$ ).

Einen wiederum hoch signifikanten Unterschied fand man in der Kontrollgruppe ( $p=0,005$ ). Hierbei war der Mittelwert nach 42 Tagen nicht ganz doppelt so groß wie nach 21 Tagen. Es ergab sich für die 42-Tage Gruppe ein Ergebnis von  $253,88\text{ }\mu\text{m}$  und nach 21 Tagen eines von  $144,21\text{ }\mu\text{m}$ .

Die mittlere trabekuläre Dichte, MTPD, gibt Auskunft über die trabekuläre Verteilung innerhalb des Osteotomiespaltes.

Mehr als doppelt so groß war der Unterschied bei der Klebervariante 1. Mit einem Mittelwert von  $2,17\text{ mm}^{-1}$  war der höhere Wert nach 21 Tagen feststellbar im

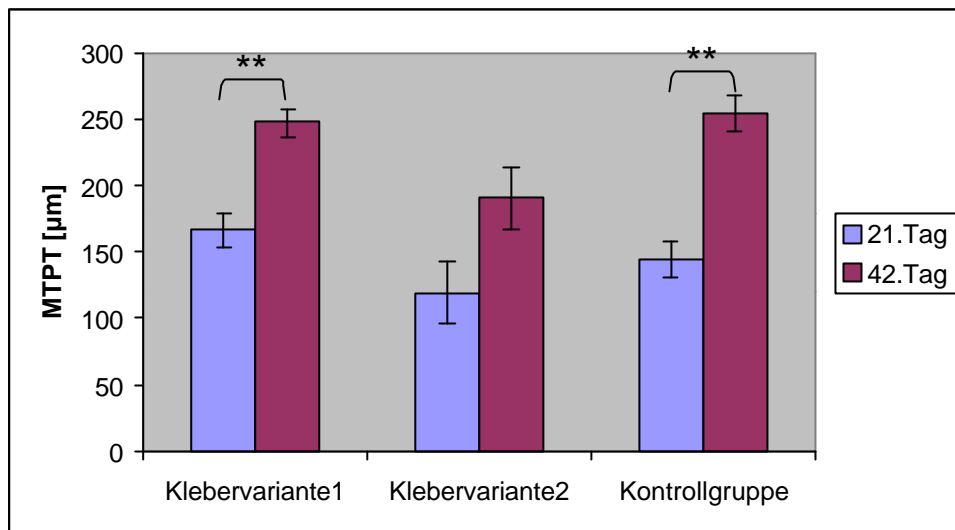


Abb. 26: MTPT der 21- und 42-Tage Kontroll- und Klebergruppen.

Vergleich mit  $0,99 \text{ mm}^{-1}$  nach 42 Tagen. Diese Differenz konnte als signifikant bezeichnet werden ( $p=0,013$ ) (Abb. 27).

Die Differenz der Ergebnisse der beiden Tage kann bei der Klebervariante 2 nicht als signifikant bezeichnet werden ( $p=0,5$ ), obwohl die Werte nach 21 Tagen 1,5mal über denen nach 42 Tagen lagen. Am 21. Tag ergab sich ein Mittelwert von  $1,51 \text{ mm}^{-1}$  im Unterschied zu  $1,05 \text{ mm}^{-1}$  nach 42 Tagen.

Ein hoch signifikanter Unterschied zeigte sich in der Kontrollgruppe ( $p=0,007$ ). Dabei waren die Unterschiede nach 21 Tagen nicht ganz doppelt so groß wie nach 42 Tagen. So betrug das Ergebnis in der 21-Tage Gruppe  $2,31 \text{ mm}^{-1}$  und in der 42-Tage Gruppe  $1,30 \text{ mm}^{-1}$ .

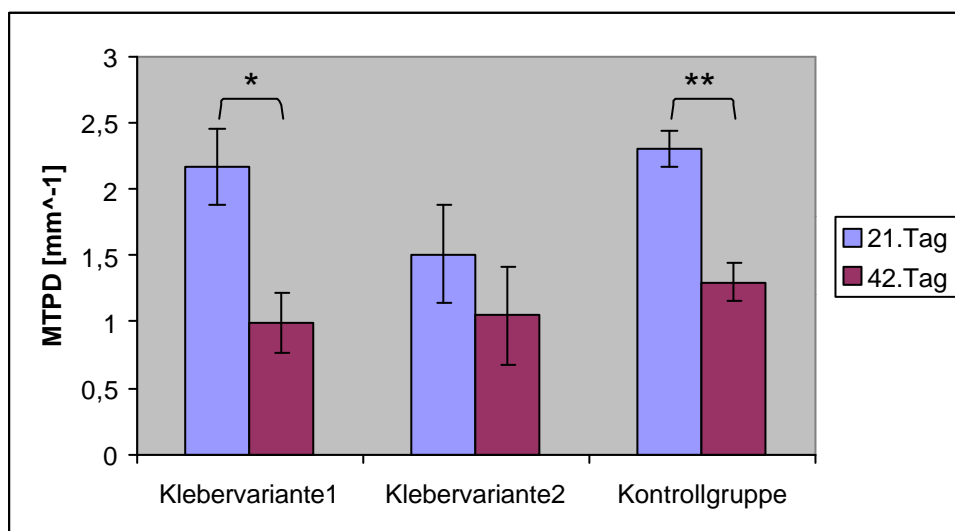


Abb. 27: MTPD der 21- und 42-Tage Kontroll- und Klebergruppen.

Es folgte die Untersuchung des Parameters MTPS (mittlere trabekuläre Separation). Dieser Parameter ist ein Indikator für die Distanz zwischen den Trabekeln.

Keine signifikante Differenz ergab sich bei der Klebervariante 1 ( $p=0,299$ ), obwohl hier nach 42 Tagen ein fünffach höherer Mittelwert im Vergleich mit der 21-Tage Gruppe ermittelt wurde (Abb. 28). Dabei betrug der Mittelwert nach 21 Tagen 442,00  $\mu\text{m}$  und nach 42 Tagen 2274,11  $\mu\text{m}$ .

Ein fast doppelt so hohes Ergebnis war am 42. Tag bei der Klebervariante 2 feststellbar. Doch auch diese Differenz konnte nicht als signifikant bezeichnet werden ( $p=0,64$ ). Der Mittelwert am 21. Tag betrug 1870,62  $\mu\text{m}$  im Vergleich zu 3336,90  $\mu\text{m}$  nach 42 Tagen.

In der Kontrollgruppe waren die Ergebnisse nach 42 Tagen ebenfalls doppelt so hoch wie nach 21 Tagen. Aber auch dieser Unterschied stellte sich als nicht signifikant heraus ( $p=0,098$ ). Dabei ergab sich ein Mittelwert von 373,57  $\mu\text{m}$  nach 21 Tagen und einer von 727,55  $\mu\text{m}$  in der 42-Tage Gruppe.

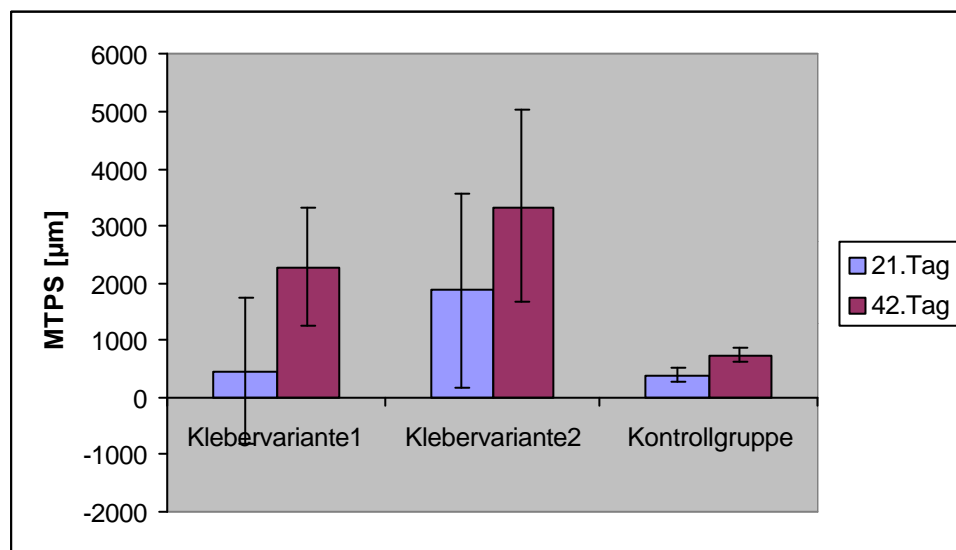


Abb. 28: MTPS der 21- und 42-Tage Kontroll- und Klebergruppen.

Als letzter knochenhistomorphometrischer Parameter wurde das Marrow Space Star Volume analysiert. Dabei werden Informationen über die dreidimensionale Vernetzung der Trabekel geliefert.

Die Klebervariante 1 zeigte hoch signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen der beiden Tage ( $p=0,001$ ) (Abb. 29). Dabei ergaben sich fast dreimal so hohe Werte für die 42-Tage Gruppe im Vergleich mit der 21-Tage Gruppe. Nach 21 Tagen lag der Mittelwert bei 0,12  $\text{mm}^3$  und am 42. Tag bei 0,34  $\text{mm}^3$ .



Sogar 3,5mal höhere Werte ergaben sich für die 42-Tage Gruppe bei der Klebervariante 2. Jedoch konnte diese Differenz nicht als signifikant bezeichnet werden ( $p=0,18$ ). Es ergab sich für die 21-Tage Gruppe ein Wert von  $0,08 \text{ mm}^3$ , im Vergleich dazu lag dieser nach 42 Tagen bei  $0,29 \text{ mm}^3$ .

Ein ganz ähnliches Ergebnis zeigte sich in der Kontrollgruppe, jedoch war der Unterschied hier hoch signifikant ( $p=0,008$ ). Der Mittelwert nach 42 Tagen lag mehr als 3,5fach über dem in der 21-Tage Gruppe. So betrug dieser am 21. Tag  $0,09 \text{ mm}^3$  und am 42. Tag  $0,34 \text{ mm}^3$ .

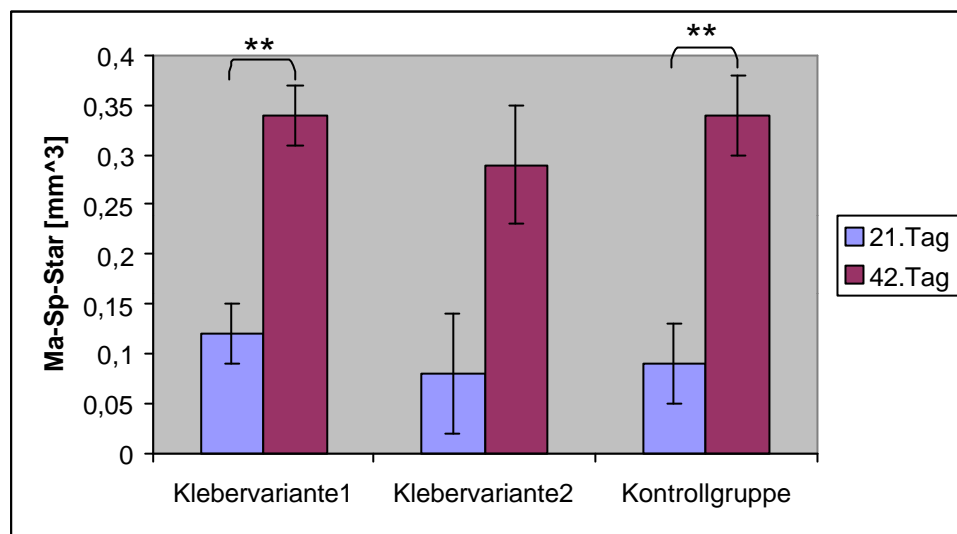


Abb. 29: Marrow Space Star Volume der 21- und 42-Tage Kontroll- und Kleberrgruppen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich die Parameter nach 21 und 42 Tagen bei der Klebervariante 1 größtenteils signifikant, teilweise sogar hoch signifikant, unterschieden. Das gleiche gilt für die Kontrollgruppe. Ausnahmen bilden dabei nur die Parameter TBV und MTPS, die keine signifikanten Unterschiede aufwiesen.

Bei der Klebervariante 2 waren keine signifikanten Unterschiede der Parameter nach 21 und 42 Tagen zu beobachten, obwohl sich die Mittelwerte fast in gleicher Weise unterschieden, wie bei den beiden anderen Gruppen.

### 3.2 Klebervariante 1 und Kontrollgruppe nach 21 und 42 Tagen

Bei dem Vergleich der Klebervariante 1 mit der Kontrollgruppe zeigten sich nach 21 Tagen keine signifikanten Unterschiede für das TBV ( $p=0,83$ ) (Abb. 30). Dabei

ergaben sich fast identische Mittelwerte. Für die Klebervariante 1 betrug dieser Mittelwert 36,68% und für die Kontrollgruppe 34,56%.

Ein fast 1,3fach höherer Mittelwert konnte für die Kontrollgruppe im Vergleich mit der Klebervariante 1 nach 42 Tagen gefunden werden. Das Ergebnis betrug für die Klebervariante 1 26,44% und für die Kontrollgruppe 34,09%. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ( $p=0,232$ ).

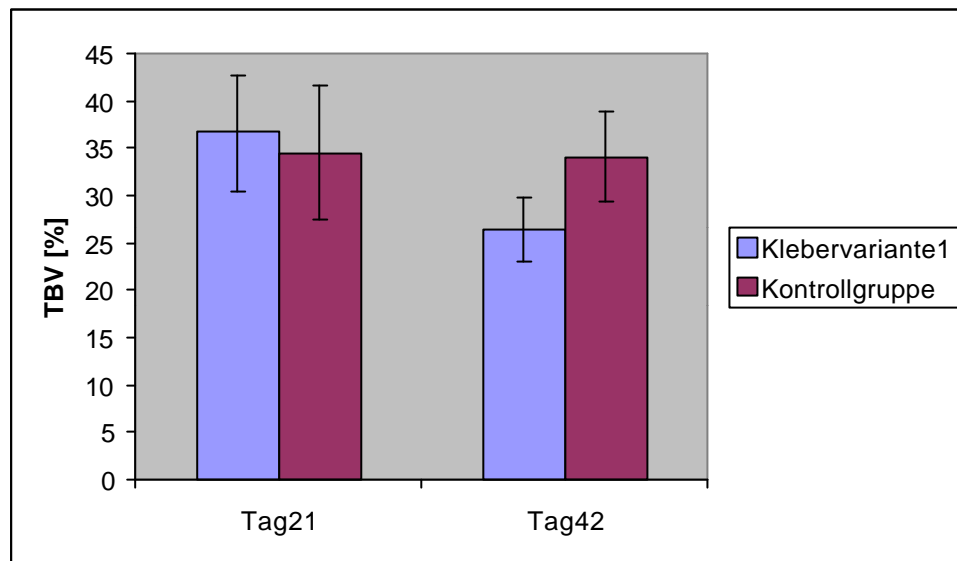


Abb. 30: TBV der Klebervariante 1 und der Kontrollgruppe nach 21 und 42 Tagen.

Auch für  $S^*v$  differierten die Ergebnisse nach 21 Tagen nicht signifikant ( $p=0,782$ ) (Abb. 31). Dabei zeigten sich mit einem Mittelwert von  $4,34 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$  für die Klebervariante 1 und einem von  $4,62 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$  in der Kontrollgruppe fast identische Ergebnisse.

Ungefähr 1,3fach größere Werte zeigten sich für die Kontrollgruppe nach 42 Tagen. Dabei zeigte sich ein Mittelwert von  $1,97 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$  für die Klebervariante 1 und einer von  $2,61 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$  in der Kontrollgruppe. Jedoch waren die Unterschiede auch hier nicht als signifikant zu bezeichnen ( $p=0,229$ ).

Nach 21 Tagen zeigten sich keine großen Unterschiede zwischen den Ergebnissen der beiden Gruppen für  $S/V$ . Für die Klebervariante 1 betrug der Mittelwert  $12,86 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$  und für die Kontrollgruppe  $14,86 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$  (Abb. 32). Diese Ergebnisse wiesen keine signifikanten Differenzen auf ( $p=0,387$ ).

Ebenfalls nicht signifikant differierten die Ergebnisse nach 42 Tagen ( $p=0,556$ ). Die

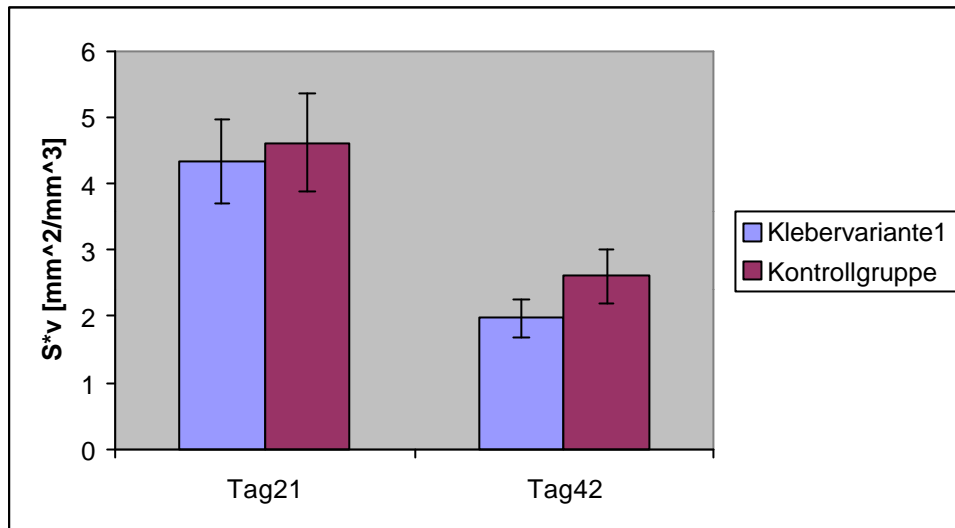


Abb. 31:  $S \cdot v$  der Klebervariante 1 und der Kontrollgruppe nach 21 und 42 Tagen.

Werte bewegten sich dabei auf annähernd gleicher Höhe. So betrug der Mittelwert für die Klebervariante 1 8,94 mm<sup>2</sup>/mm<sup>3</sup> und für die Kontrollgruppe 8,14 mm<sup>2</sup>/mm<sup>3</sup>.

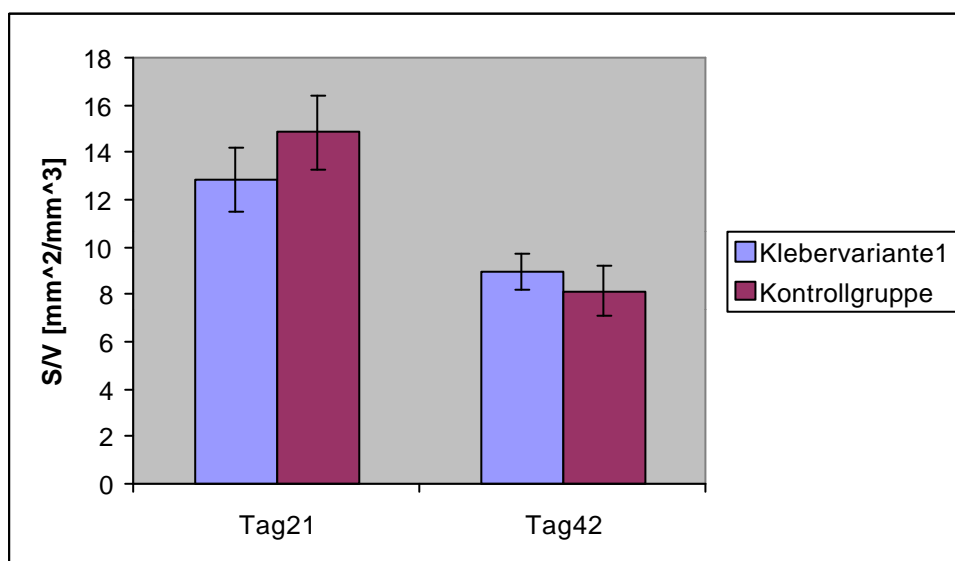


Abb. 32:  $S/V$  der Klebervariante 1 und der Kontrollgruppe nach 21 und 42 Tagen.

Bei der Untersuchung des Parameters MTPT ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Klebervariante 1 und der Kontrollgruppe nach 21 Tagen feststellen ( $p=0,237$ ) (Abb. 33). So lagen auch die Mittelwerte eng zusammen mit 166,31 µm für die Klebervariante 1 und 144,21 µm für die Kontrollgruppe.

Auch nach 42 Tagen lagen die Mittelwerte der beiden Gruppen dicht beieinander. Für die Klebervariante 1 zeigte sich ein Ergebnis von 247,89 µm und für die

Kontrollgruppe von 253,88  $\mu\text{m}$ . Diese geringe Differenz konnte auch nicht als signifikant bezeichnet werden ( $p=0,766$ ).

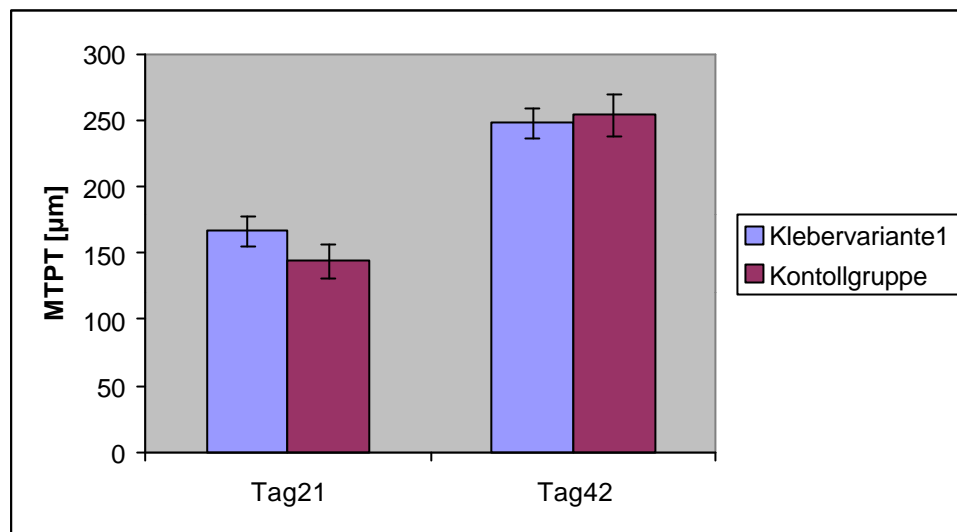


Abb. 33: MTPPT der Klebervariante 1 und der Kontrollgruppe nach 21 und 42 Tagen.

Dicht zusammen liegende Mittelwerte ergaben sich nach 21 Tagen für den Parameter MTPD. Dabei zeigten sich Werte von 2,17  $\text{mm}^{-1}$  für die Klebervariante 1 und von 2,31  $\text{mm}^{-1}$  für die Kontrollgruppe (Abb. 34). Für diesen Unterschied konnten keine Signifikanzen ermittelt werden ( $p=0,781$ ).

Nach 42 Tagen konnte man zwar eine leicht größere Differenz der Mittelwerte beobachten, jedoch war diese ebenfalls nicht signifikant ( $p=0,229$ ). Bei der Klebervariante 1 wurde ein Ergebnis von 0,99  $\text{mm}^{-1}$  ermittelt, für die Kontrollgruppe eines von 1,30  $\text{mm}^{-1}$ .

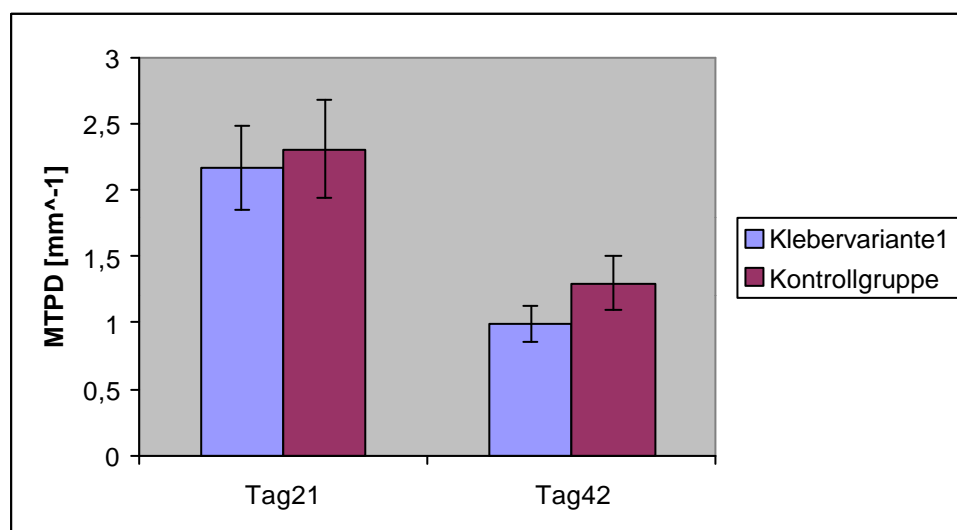


Abb. 34: MTPD der Klebervariante 1 und der Kontrollgruppe nach 21 und 42 Tagen.

Für MTPS zeigten sich nach 21 Tagen erkennbar höhere Werte für die Klebervariante 1 im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Doch waren diese Unterschiede nicht signifikant ( $p=0,767$ ) (Abb. 35). Es ließ sich ein Mittelwert von 442,00  $\mu\text{m}$  für die Klebervariante 1 und von 373,57  $\mu\text{m}$  für die Kontrollgruppe beobachten.

Dreimal so hohe Werte waren nach 42 Tagen für die Klebervariante 1 zu beobachten. Dabei betrug der Mittelwert für die Klebervariante 1 2274,11  $\mu\text{m}$  und für die Kontrollgruppe 727,55  $\mu\text{m}$ . Doch trotz dieser großen Differenz waren keine Signifikanzen feststellbar ( $p=0,448$ ).

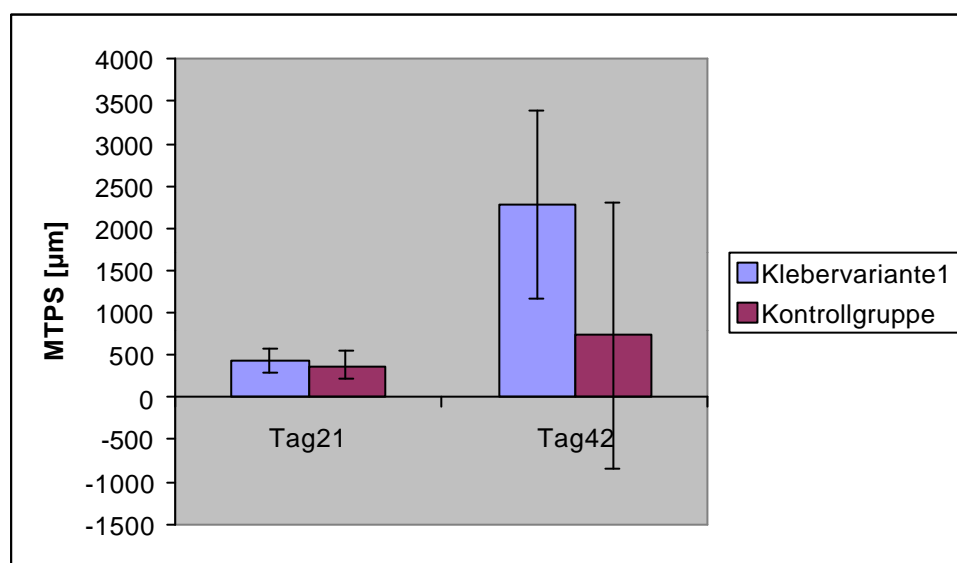


Abb. 35: MTPS der Klebervariante 1 und der Kontrollgruppe nach 21 und 42 Tagen.

Nach 21 Tagen waren für den Parameter Marrow Space Star Volume keine Signifikanzen zu beobachten ( $p=0,297$ ) (Abb. 36). Die Ergebnisse lagen dabei auch dicht beieinander, mit dem leicht höheren Wert für die Klebervariante 1. Der Mittelwert für die Klebervariante 1 betrug dabei 0,12  $\text{mm}^3$  und der für die Kontrollgruppe 0,09  $\text{mm}^3$ .

Sogar identische Mittelwert fand man bei dem Vergleich der beiden Gruppen nach 42 Tagen. Dabei konnten dann auch keine Signifikanzen gefunden werden ( $p=0,970$ ). Das Ergebnis bei beiden Gruppen lautete 0,34  $\text{mm}^3$ .

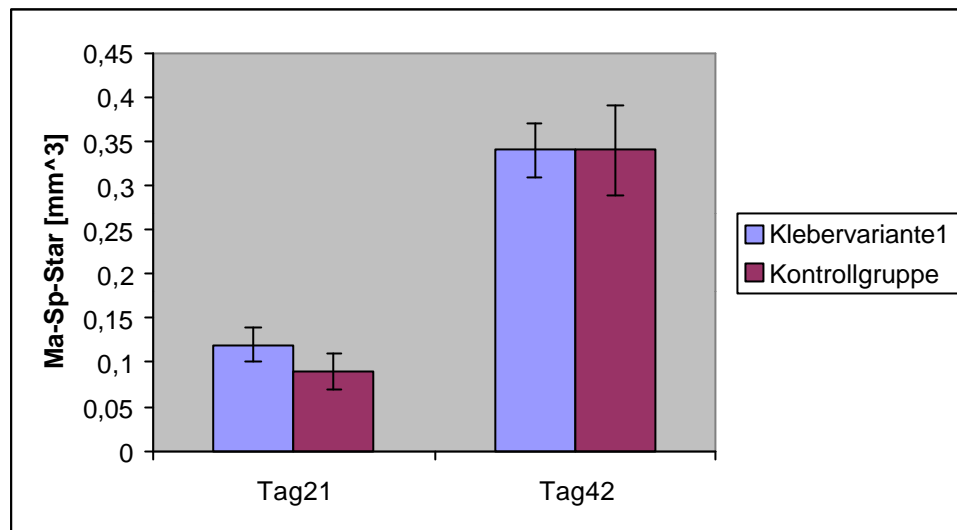


Abb. 36: Marrow Space Star Volume der Klebervariante 1 und der Kontrollgruppe nach 21 und 42 Tagen.

Bei dem Vergleich der Klebervariante 1 mit der Kontrollgruppe konnte man nach 21 Tagen für keinen der gemessenen Parameter einen signifikanten Unterschied beobachten. Auch die Mittelwerte differierten nur in geringem Ausmaß.

Nach 42 Tagen waren die Unterschiede ebenfalls nicht als signifikant zu bezeichnen, jedoch traten deutlichere Unterschiede der Mittelwerte auf.

### 3.3 Ergebnisse innerhalb eines Osteotomiespalts nach 21 und 42 Tagen

Bei dem Vergleich der histomorphometrischen Ergebnisse innerhalb eines Osteotomiespalts wurden die drei Messfeldquadranten innerhalb des Osteotomiespalts nach 21 und 42 Tagen miteinander verglichen. Dabei lag der 1. Quadrant im gelenknahen Bereich, der 2. Quadrant zentral und der 3. Quadrant im gelenkfernen Bereich. Die Daten wurden über die Klebervariante 1 und die Kontrollgruppe gemittelt, da sich zwischen beiden keine signifikanten Unterschiede zeigten und auf diese Weise eine größere Zahl von Tieren zum Vergleich herangezogen werden konnte.

Die Ergebnisse für TBV nach 21 Tagen zeigten zwischen den einzelnen Messfeldern keine großen Unterschiede. Dabei konnten auch keine Signifikanzen festgestellt werden ( $p=0,86$ ) (Abb. 37). Die Mittelwerte betrugen für das 1. Feld 33,42%, für das 2. Feld 37,07% und für das 3. Feld 36,37%.

Ein anderes Bild zeigte sich nach 42 Tagen. Hier war der Mittelwert für das 1. Feld mit 45,83% rund doppelt so hoch wie für die Felder 2 und 3 mit 23,62% und 21,36%. Die Unterschiede waren hier sogar hoch signifikant ( $p_{1+2}=0,001$ ;  $p_{1+3}=0,004$ ). Zwischen den Feldern 2 und 3 konnte dabei keine signifikante Differenz beobachtet werden ( $p_{2+3}=0,9$ ).

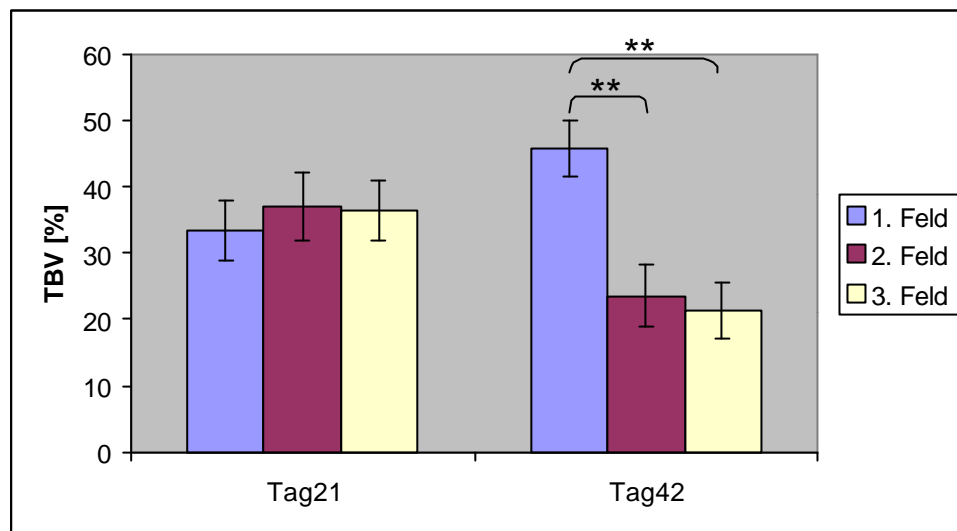


Abb. 37: TBV der drei Messfelder innerhalb des Osteotomiespaltes nach 21 und 42 Tagen.

Bei der Betrachtung des Parameters  $S^*v$  nach 21 Tagen ließen sich keine signifikanten Unterschiede der Felder feststellen ( $p=0,64$ ) (Abb. 38). Auch waren die Differenzen zwischen den Feldern nicht sehr groß. Dabei wurde für das 1. Feld  $4,27 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$ , für das 2. Feld  $4,79 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$  und für das 3. Feld  $4,39 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$  gemessen.

Nach 42 Tagen konnten wiederum hoch signifikante Unterschiede zwischen dem 1. Feld und den Feldern 2 und 3 beobachtet werden ( $p_{1+2}=0,002$ ;  $p_{1+3}=0,005$ ). Der Mittelwert des 1. Feldes mit  $3,22 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$  war dabei fast doppelt so hoch wie in den beiden anderen Feldern. Deren Mittelwerte mit  $1,93 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$  für das 2. Feld und  $1,72 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$  für das 3. Feld unterschieden sich dabei nicht signifikant ( $p_{2+3}=0,6$ ).

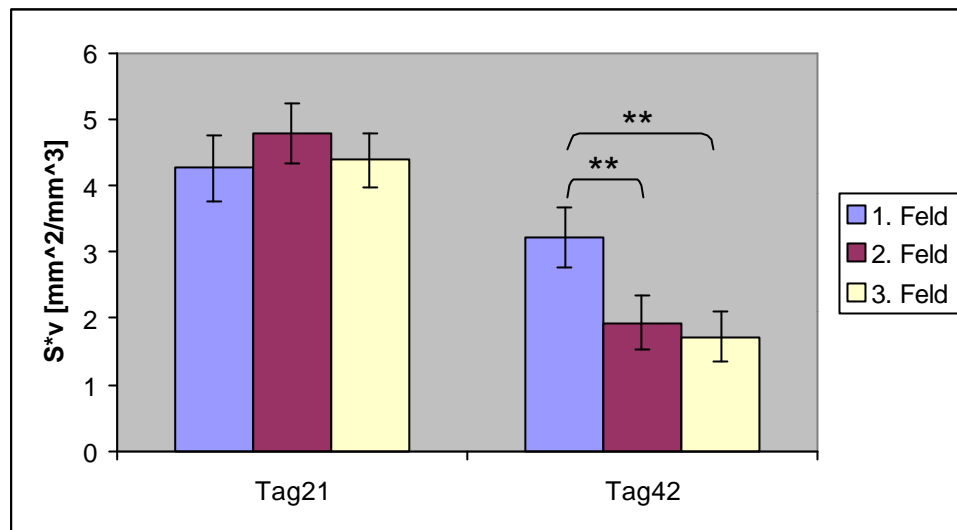


Abb. 38: S\*v der drei Felder innerhalb des Osteotomiespaltes nach 21 und 42 Tagen.

Nach 21 Tagen lagen für S/V die Mittelwerte der einzelnen Felder relativ dicht beieinander. Mit einem Ergebnis von  $14,56 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$  beim 1. Feld, von  $13,74 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$  beim 2. Feld und von  $13,29 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$  beim 3. Feld waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar ( $p=0,9$ ) (Abb. 39).

Signifikante Unterschiede wurden nach 42 Tagen bei dem Vergleich des 1. Feldes mit den beiden anderen gemessen ( $p_{1+2}=0,03$ ;  $p_{1+3}=0,011$ ). Dabei lagen die Werte der Felder 2 und 3 ca. 1,3fach über dem des 1. Feldes mit  $7,07 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$ . Die Mittelwerte für die Felder 2 und 3 lagen mit  $9,36 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$  und  $9,19 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$  dicht zusammen und wiesen auch keine signifikante Differenz auf ( $p_{2+3}=0,7$ ).

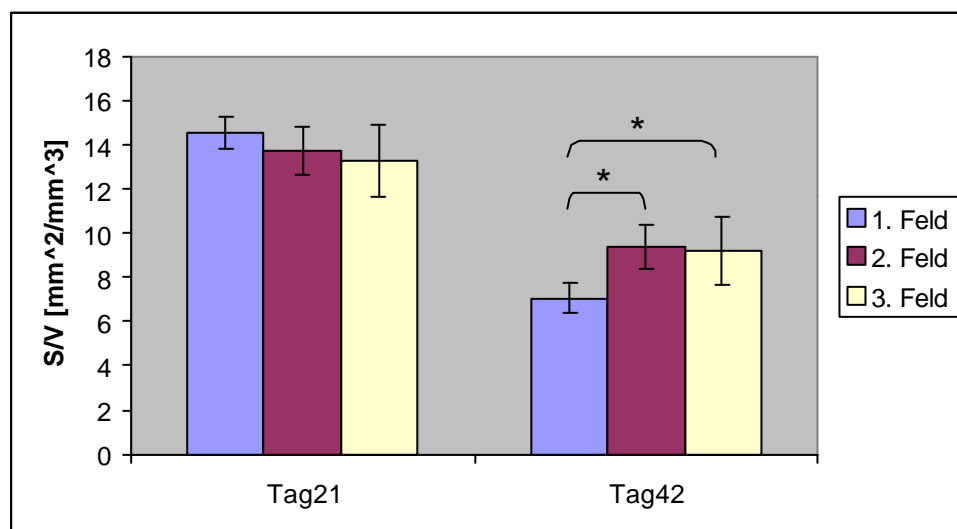


Abb. 39: S/V der drei Felder innerhalb des Osteotomiespaltes nach 21 und 42 Tagen.



Wenig differierende Mittelwerte wiesen die drei Felder nach 21 Tagen für den Parameter MTPT auf, wobei auch keine Signifikanzen gefunden werden konnten ( $p=0,7$ ) (Abb. 40). Das Ergebnis für das 1. Feld betrug  $149,86 \mu\text{m}$ , für das 2. Feld  $151,58 \mu\text{m}$  und für das 3. Feld  $164,33 \mu\text{m}$ .

Nach 42 Tagen waren die Unterschiede zwischen dem 1. Feld und den Feldern 2 und 3 als hoch signifikant zu bezeichnen ( $p_{1+2}=0,009$ ;  $p_{1+3}=0,01$ ). Dabei lag der Mittelwert von  $287,77 \mu\text{m}$  für das 1. Feld ungefähr um den Faktor 1,25 über denen der Felder 2 und 3 mit  $227,57 \mu\text{m}$  und  $237,31 \mu\text{m}$ . Die Felder 2 und 3 unterschieden sich ihrerseits nicht signifikant ( $p_{2+3}=0,38$ ).

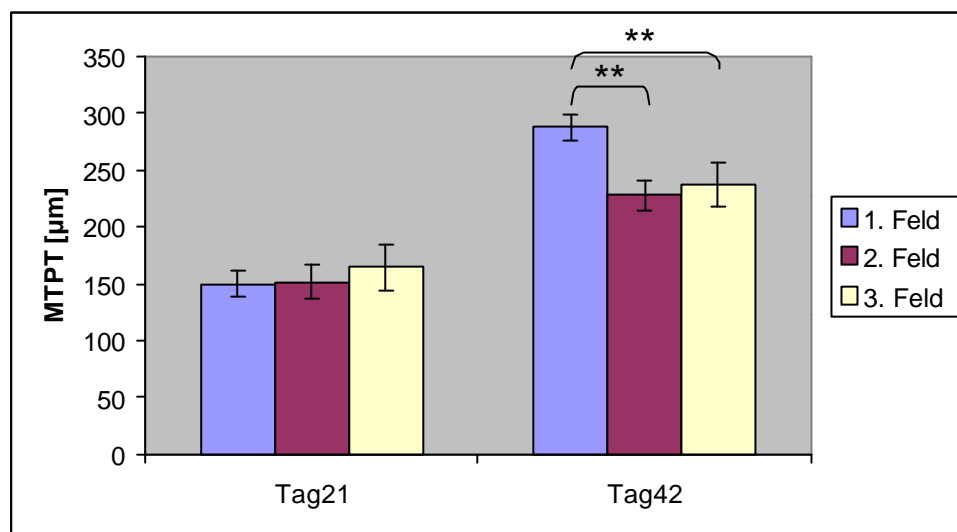


Abb. 40: MTPT der drei Felder innerhalb des Osteotomiespaltes nach 21 und 42 Tagen.

Nach 21 Tagen gab es für MTPD keine bedeutenden Unterschiede zwischen den drei Feldern. Dabei zeigten sich Mittelwerte von  $2,13 \text{ mm}^{-1}$  für das 1. Feld,  $2,40 \text{ mm}^{-1}$  für das 2. Feld und von  $2,19 \text{ mm}^{-1}$  für das 3. Feld (Abb. 41). Diese Unterschiede waren nicht signifikant ( $p=0,64$ ).

Hoch signifikante Unterschiede ließen sich am 42. Tag finden ( $p_{1+2}=0,002$ ;  $p_{1+3}=0,005$ ). Dabei lag der Mittelwert des 1. Feldes, verglichen mit den beiden anderen Feldern, fast doppelt so hoch. Keine signifikanten Differenzen konnten für die Felder 2 und 3 festgelegt werden ( $p_{2+3}=0,6$ ). Es ergab sich für das 1. Feld ein Wert von  $1,61 \text{ mm}^{-1}$ , für das 2. Feld einer von  $0,96 \text{ mm}^{-1}$  und für das 3. Feld einer von  $0,86 \text{ mm}^{-1}$ .

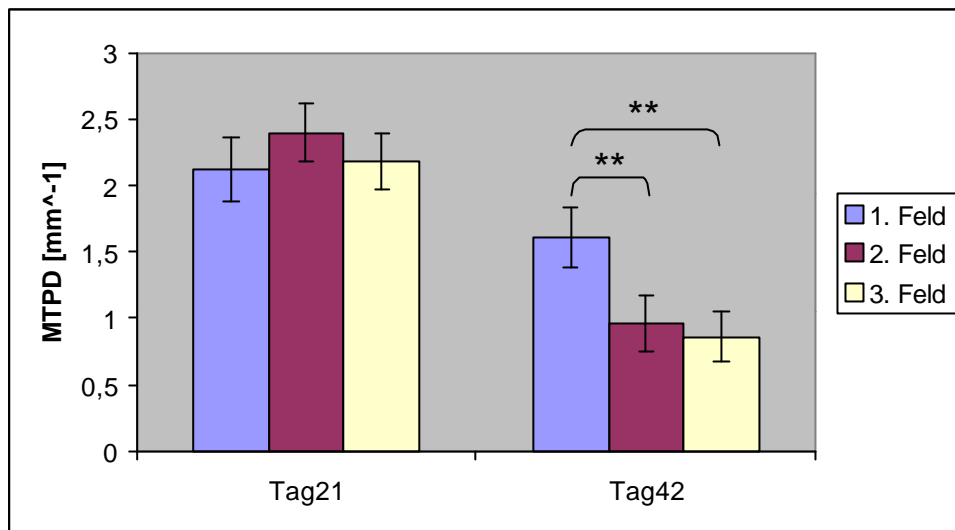


Abb. 41: MTPD der drei Felder innerhalb des Osteotomiespaltes nach 21 und 42 Tagen.

Für den Parameter MTPS ließen sich am 21. Tag keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Feldern finden ( $p=0,6$ ), wobei die Mittelwerte der Felder 1 und 3 mit  $449,34 \mu\text{m}$  und  $470,89 \mu\text{m}$  ungefähr 1,5mal über denen des 2. Feldes mit  $303,13 \mu\text{m}$  lagen (Abb. 42).

Signifikante Unterschiede ließen sich wieder nach 42 Tagen zwischen den Feldern 1 und 3 beobachten ( $p_{1+3}=0,023$ ). Dabei lag der Mittelwert des 3. Feldes mit  $2745,97 \mu\text{m}$  7mal so hoch wie der des 1. Feldes mit  $400,97 \mu\text{m}$ . Die Unterschiede zwischen den Felder 1 und 2 waren sogar hoch signifikant ( $p_{1+2}=0,006$ ), wobei die Ergebnisse des 2. Feldes mit  $1355,56 \mu\text{m}$  3,5fach über denen des 1. Feldes lagen. Obwohl die Ergebnisse des 3. Feldes doppelt so hoch waren wie die des 2. Feldes, konnte dieser Unterschied nicht als signifikant bezeichnet werden ( $p_{2+3}=0,35$ ).

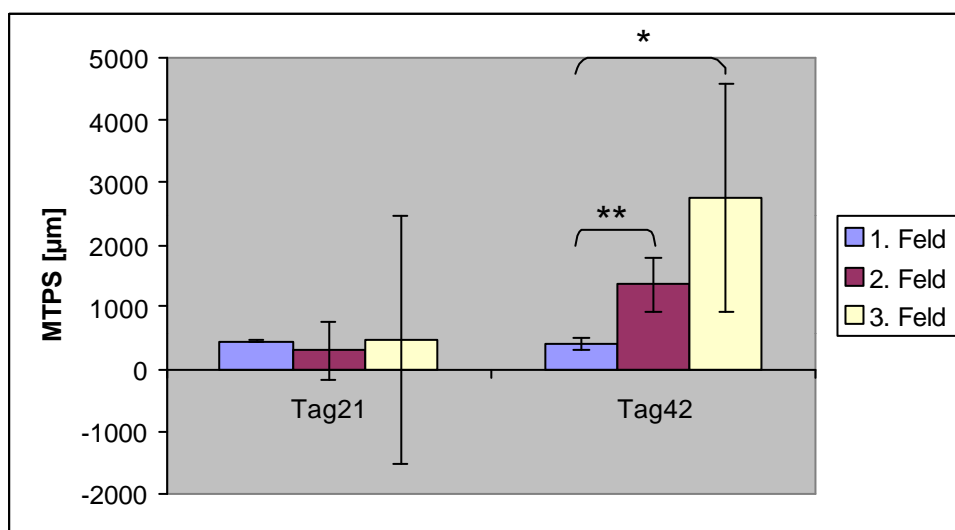


Abb. 42: MTPS der drei Felder innerhalb des Osteotomiespaltes nach 21 und 42 Tagen.

Für das Marrow Space Star Volume konnten nach 21 Tagen zwischen den drei Feldern keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden ( $p=0,2$ ) (Abb. 43). Die Mittelwerte differierten dabei nur geringfügig. Das Ergebnis des 1. Feldes war  $0,10 \text{ mm}^3$ , das des 2. Feldes  $0,08 \text{ mm}^3$  und das des 3. Feldes  $0,13 \text{ mm}^3$ .

Ungefähr doppelt so groß war der Mittelwert des 1. Feldes im Vergleich mit den Feldern 2 und 3 nach 42 Tagen. Zwischen dem 1. und dem 3. Feld konnte eine signifikante Differenz beobachtet werden ( $p_{1+3}=0,013$ ). Der Unterschied zwischen den Feldern 1 und 2 war sogar hoch signifikant ( $p_{1+2}=0,005$ ). Dabei wies das 1. Feld ein Ergebnis von  $0,48 \text{ mm}^3$ , das 2. Feld eines von  $0,25 \text{ mm}^3$  und das 3. Feld eines von  $0,30 \text{ mm}^3$  auf. Der Vergleich der Felder 2 und 3 ergab dabei keine signifikanten Unterschiede ( $p_{2+3}=0,22$ ).

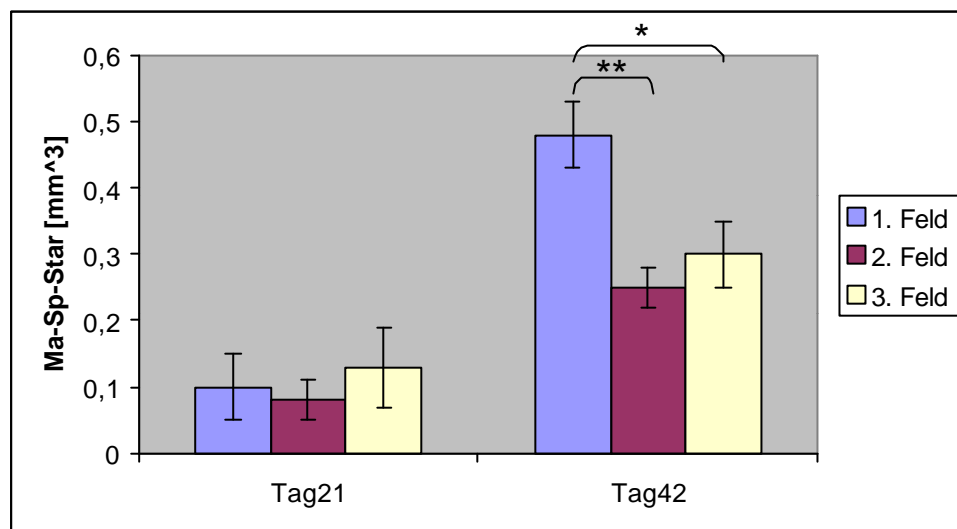


Abb. 43: Marrow Space Star Volume der drei Felder innerhalb des Osteotomiespaltes nach 21 und 42 Tagen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass nach 21 Tagen bei keinem der gemessenen Parameter ein signifikanter Unterschied zwischen den drei Messfeldern beobachtet werden konnte. Auch anhand der Mittelwerte ließen sich keine großen Unterschiede zwischen den drei Messfeldern ableiten.

Ein anderes Bild zeigte sich am 42. Tag. Hier ließen sich zwischen dem 1. Feld und den beiden anderen Feldern signifikante bis hoch signifikante Unterschiede feststellen. Die Mittelwerte differierten teilweise um den Faktor 2 und höher. Die Felder 2 und 3 differierten ihrerseits für keinen Parameter signifikant. Ebenfalls lagen die Mittelwerte dicht beieinander.

### 3.4 Vergleich der Schnittebenen nach 21 und 42 Tagen

Hierbei wurden die histomorphometrischen Ergebnisse des 1. Schnittes, aus der zentralen Etage, mit denen des 2. Schnittes, aus der ventralen Etage, nach 21 und 42 Tagen verglichen. Die Daten wurden über die Ergebnisse der Klebervariante 1 und der Kontrollgruppe gemittelt, da sich die Ergebnisse der beiden Gruppen nicht signifikant voneinander unterschieden. Hiermit erreichte man eine größere Anzahl von vergleichbaren Präparaten.

Für den Parameter TBV zeigten sich nach 21 Tagen nur leicht differierende Ergebnisse zwischen den beiden Schnitten. Der leicht höhere Wert lag bei dem 1. Schnitt mit 37,42%, wobei der 2. Schnitt einen Mittelwert von 33,82% aufwies (Abb. 44). Diese geringe Differenz konnte nicht als signifikant bezeichnet werden ( $p=0,06$ ).

Ein signifikanter Unterschied konnte dafür nach 42 Tagen beobachtet werden ( $p=0,02$ ). Hierbei lag der Mittelwert des 2. Schnittes 1,3fach über dem des 1. Schnittes. So betrug der Wert des 1. Schnittes 26,31% und im Vergleich dazu der des 2. Schnittes 34,23%.

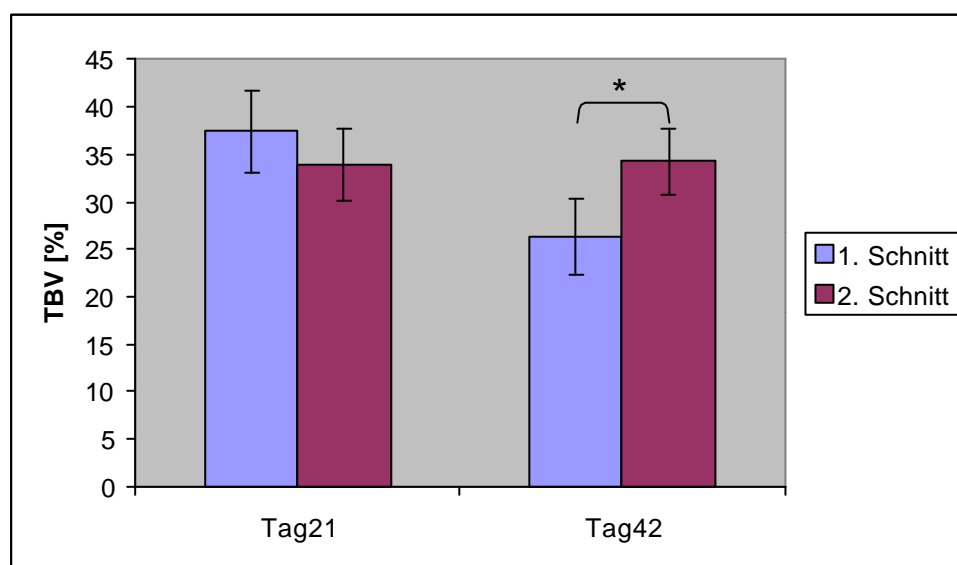


Abb. 44: TBV der Schnittebenen nach 21 und 42 Tagen.

Keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Schnitten konnte man nach 21 Tagen für den Parameter  $S^*v$  beobachten ( $p=0,1$ ) (Abb. 45). Auch die Ergebnisse lagen dicht zusammen. Der 1. Schnitt wies dabei einen Mittelwert von  $4,75 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$  auf, der 2. Schnitt von  $4,21 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$ .

Nach 42 Tagen sah dieser Unterschied nicht viel anders aus. Auch hier war keine signifikante Differenz festzustellen ( $p=0,09$ ). Der 1. Schnitt wies das leicht geringere Ergebnis mit  $2,08 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$  auf im Vergleich mit  $2,50 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$  beim 2. Schnitt.

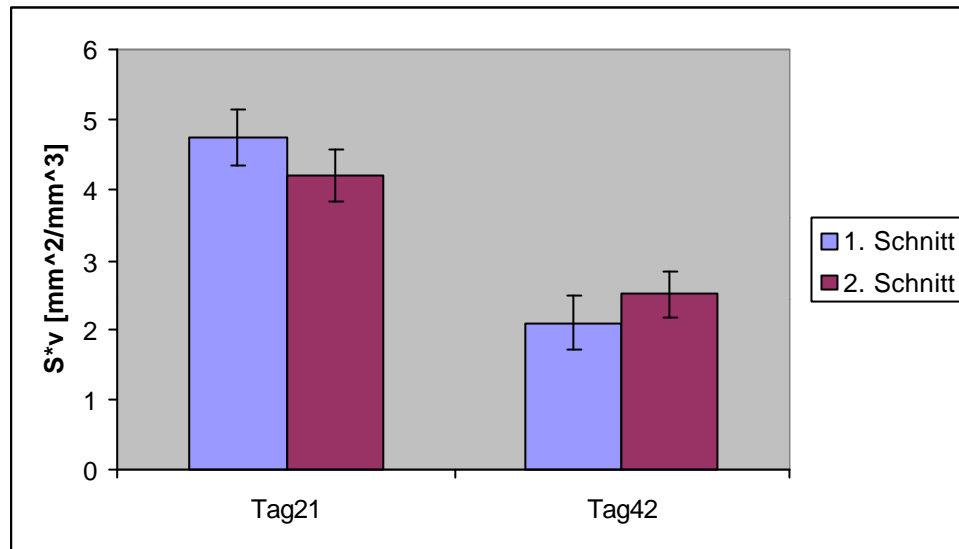


Abb. 45:  $S \cdot v$  der Schnittebenen nach 21 und 42 Tagen.

Die Mittelwerte der beiden Schnitte für  $S/V$  differierten nach 21 Tagen kaum. So ergab sich für den 1. Schnitt ein Wert von  $14,01 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$ , der sich nicht signifikant von dem Wert des 2. Schnittes mit  $13,72 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$  unterschied ( $p=0,8$ ) (Abb. 46).

Gleiches gilt für die Ergebnisse nach 42 Tagen. Dabei konnten ebenfalls keine Signifikanzen festgelegt werden ( $p=0,41$ ). Die Mittelwerte von  $8,82 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$  für den 1. Schnitt und von  $8,26 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$  für den 2. Schnitt unterschieden sich nur wenig.

Nach 21 Tagen lagen die Ergebnisse der beiden Schnitte für den Parameter MTPT relativ dicht beieinander. Der 1. Schnitt wies dabei einen Mittelwert von  $151,22 \mu\text{m}$  auf, der 2. Schnitt von  $159,30 \mu\text{m}$  (Abb. 47). Signifikanzen konnten nicht festgestellt werden ( $p=0,18$ ).

Ein signifikanter Unterschied konnte jedoch nach 42 Tagen beobachtet werden ( $p=0,02$ ). Hierbei wies der 2. Schnitt einen leicht höheren Wert im Vergleich mit dem 1. Schnitt auf. Der 1. Schnitt ergab einen Mittelwert von  $238,81 \mu\text{m}$  und der 2. Schnitt einen von  $262,96 \mu\text{m}$ .

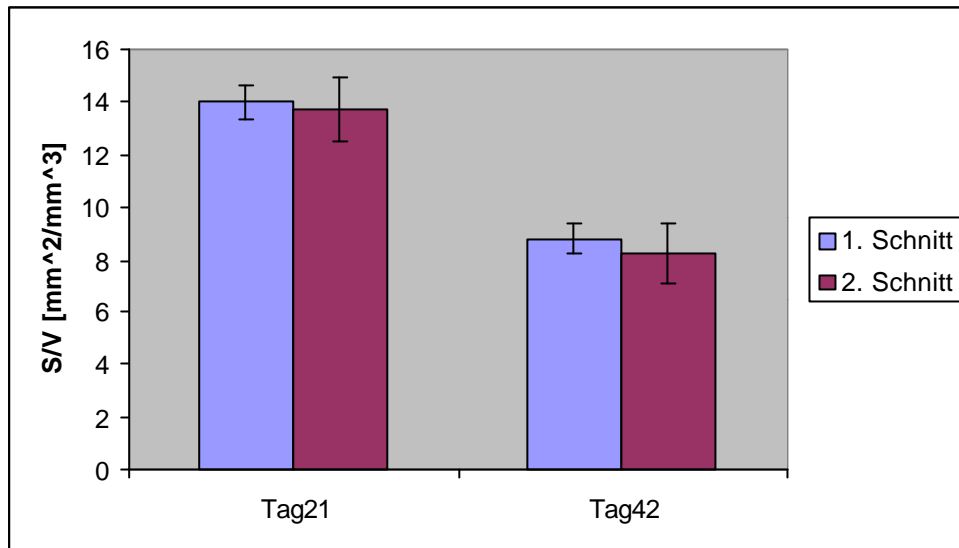


Abb. 46: S/V der Schnittebenen nach 21 und 42 Tagen.

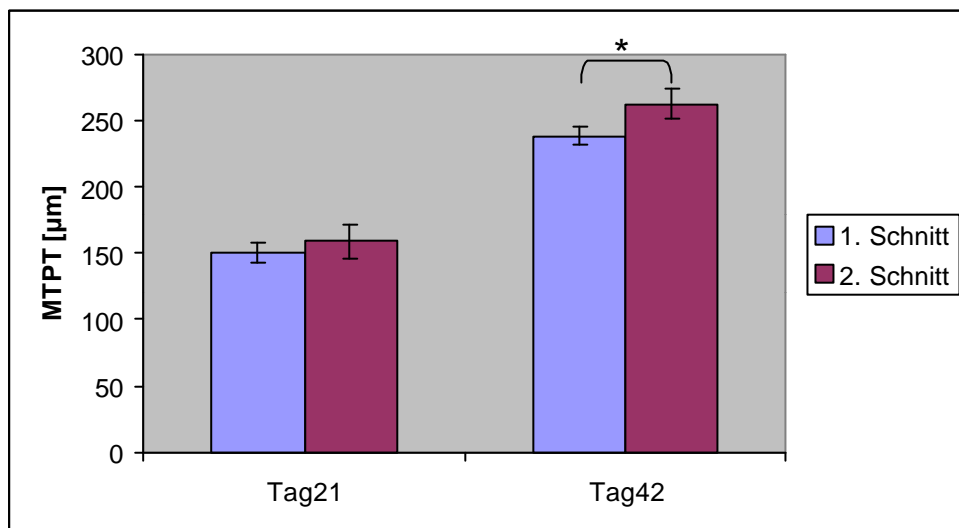


Abb. 47: MTPPT der Schnittebenen nach 21 und 42 Tagen.

Bei der Untersuchung des Parameters MTPD konnten für den 21. Tag keine Signifikanzen bei dem Vergleich der beiden Schnittebenen gefunden werden ( $p=0,1$ ) (Abb. 48). Die Mittelwerte unterschieden sich nur in geringem Ausmaß. Für den 1. Schnitt wurde ein leicht höheres Ergebnis von  $2,38 \text{ mm}^{-1}$  im Vergleich mit dem 2. Schnitt mit  $2,11 \text{ mm}^{-1}$  beobachtet.

Ebenfalls nicht signifikant differierten die Ergebnisse nach 42 Tagen ( $p=0,09$ ). Auch lagen die Mittelwerte hier dicht zusammen. Dabei betrug der Wert für den 1. Schnitt  $1,04 \text{ mm}^{-1}$  und für den 2. Schnitt  $1,25 \text{ mm}^{-1}$ .

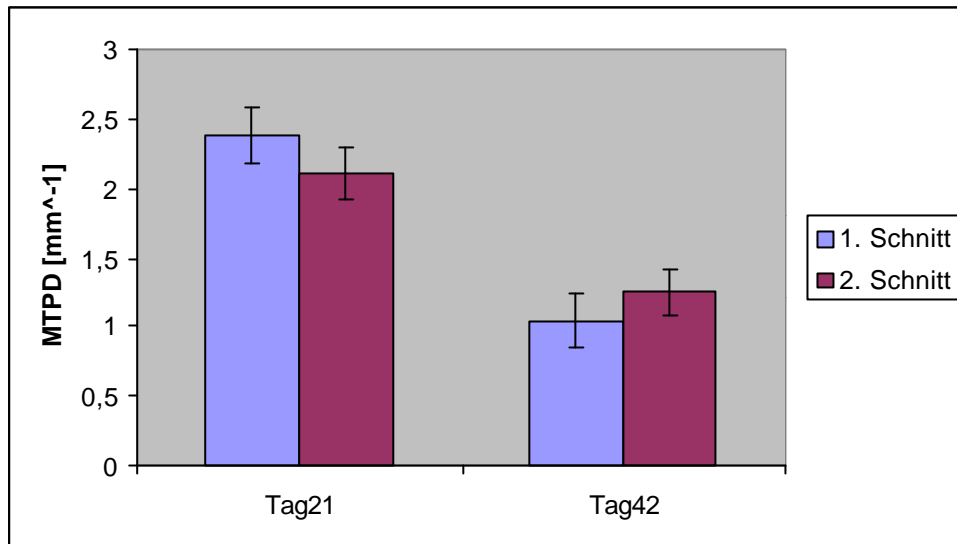


Abb. 48: MTPD der Schnittebenen nach 21 und 42 Tagen.

Für MTPS unterschieden sich die Ergebnisse nach 21 Tagen ungefähr um den Faktor 1,25. Dabei lag der höhere Wert bei dem 2. Schnitt mit 459,09  $\mu\text{m}$  (Abb. 49). Der Mittelwert für den 1. Schnitt betrug 356,48  $\mu\text{m}$ . Jedoch war keine signifikante Differenz zu beobachten ( $p=0,4$ ).

Der Unterschied der beiden Schnittebenen war nach 42 Tagen noch größer, jedoch war hier ebenfalls keine Signifikanz festzustellen ( $p=0,46$ ). Der Mittelwert von 1885,55  $\mu\text{m}$  des 2. Schnittes lag dabei ungefähr 1,7fach über dem des 1. Schnittes mit 1116,12  $\mu\text{m}$ .

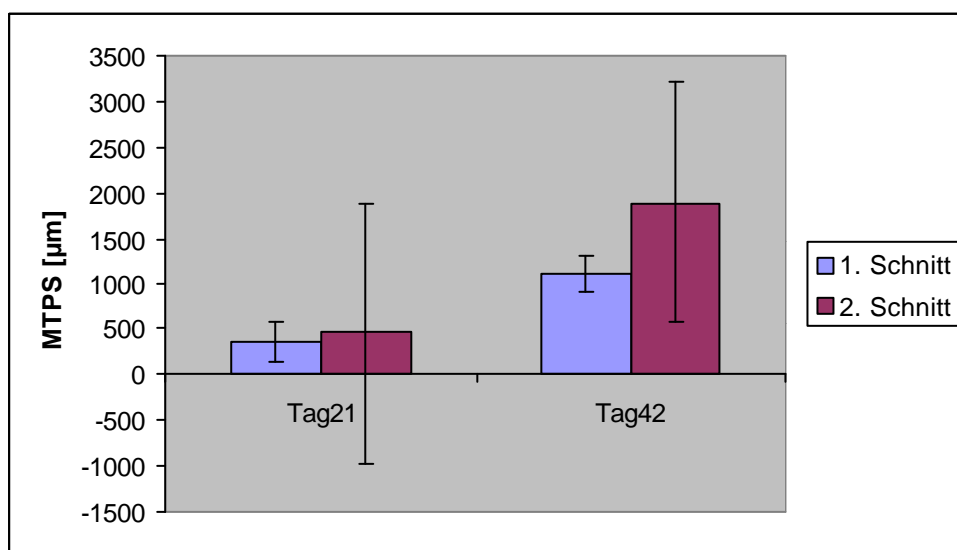


Abb. 49: MTPS der Schnittebenen nach 21 und 42 Tagen.

Am 21. Tag konnten für Marrow Space Star Volume keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Schnitten gefunden werden ( $p=0,15$ ) (Abb. 50). Dabei fand sich der leicht höhere Mittelwert mit  $0,12 \text{ mm}^3$  bei dem 2. Schnitt. Das Ergebnis des 1. Schnittes betrug  $0,09 \text{ mm}^3$ .

Ein signifikanter Unterschied ließ sich nach 42 Tagen beobachten, obwohl die Ergebnisse recht dicht beieinander lagen ( $p=0,04$ ). Der höhere Mittelwert von  $0,38 \text{ mm}^3$  konnte für den 2. Schnitt ermittelt werden, der für den 1. Schnitt lag bei  $0,30 \text{ mm}^3$ .

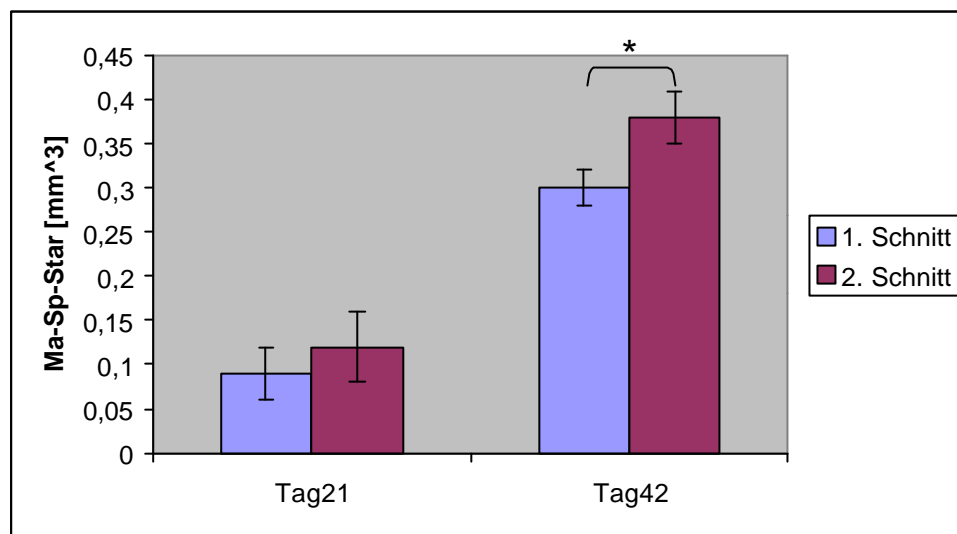


Abb. 50: Marrow Space Star Volume der Schnittebenen nach 21 und 42 Tagen.

Abschließend kann man sagen, dass sich kaum signifikante Unterschiede zwischen den beiden Schnittebenen finden ließen. Nach 21 Tagen bestanden nur geringe Differenzen der Mittelwerte zwischen den beiden Schnitten, die nicht signifikant waren.

Deutlicher traten diese Unterschiede nach 42 Tagen hervor. Hierbei ließen sich auch bei einzelnen Parametern, vor allen Dingen TBV, MTPT und Marrow Space Star Volume, signifikante Unterschiede feststellen.

### 3.5 Vergleich der Klebervarianten nach 21 und 42 Tagen

Für den Parameter TBV ließen sich nach 21 Tagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Klebervarianten feststellen ( $p=0,28$ ) (Abb. 51). Dabei lag der



Mittelwert der Klebervariante 1 mit 36,68% annähernd 1,7fach über dem der Klebervariante 2 mit 21,76%.

Die Mittelwerte der beiden Klebervarianten nach 42 Tagen differierten kaum und unterschieden sich auch nicht signifikant ( $p=0,83$ ). Dabei lag das Ergebnis der Klebervariante 1 mit 26,44% leicht über dem der Klebervariante 2 mit 24,22%.

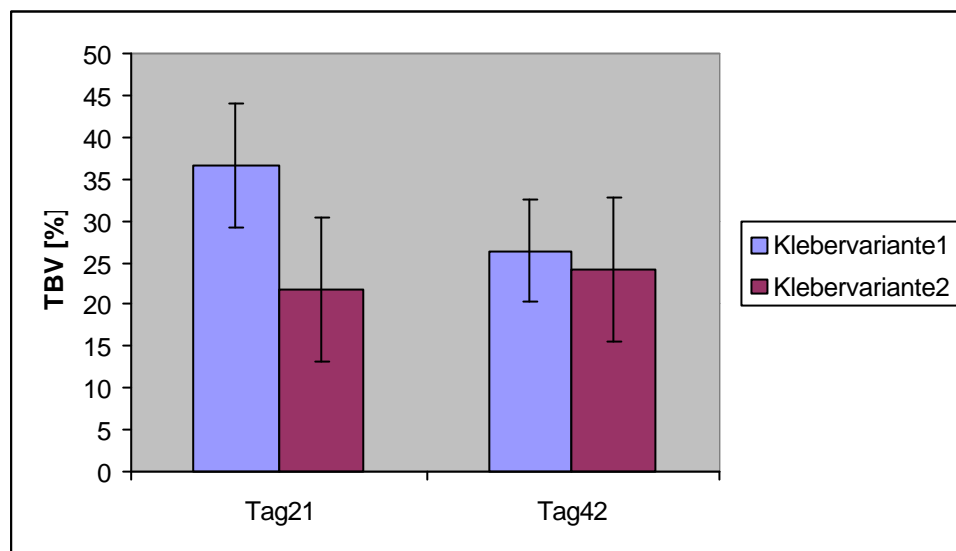


Abb. 51: TBV der Klebervarianten nach 21 und 42 Tagen.

Nach 21 Tagen ließ sich für  $S^*v$  ein mehr als 1,4fach höherer Wert der Klebervariante 1 im Vergleich mit der Klebervariante 2 beobachten. Jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant ( $p=0,33$ ) (Abb. 52). Das Ergebnis der Klebervariante 1 betrug  $4,34 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$ , das der Klebervariante 2  $3,03 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$ .

Auch nach 42 Tagen konnte man keine signifikante Differenz zwischen den beiden Klebervarianten feststellen ( $p=0,85$ ). Dabei lagen die Mittelwerte mit  $1,97 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$  für die Klebervariante 1 und  $2,11 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$  für die Klebervariante 2 dicht zusammen.

Doppelt so hohe Mittelwerte wies die Klebervariante 2 im Vergleich mit der Klebervariante 1 für den Parameter  $S/V$  auf. Der Wert für die Klebervariante 1 betrug dabei  $12,86 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$ , der für die Klebervariante 2  $24,43 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$  (Abb. 53). Trotz dieses großen Unterschiedes war keine Signifikanz feststellbar ( $p=0,09$ ).

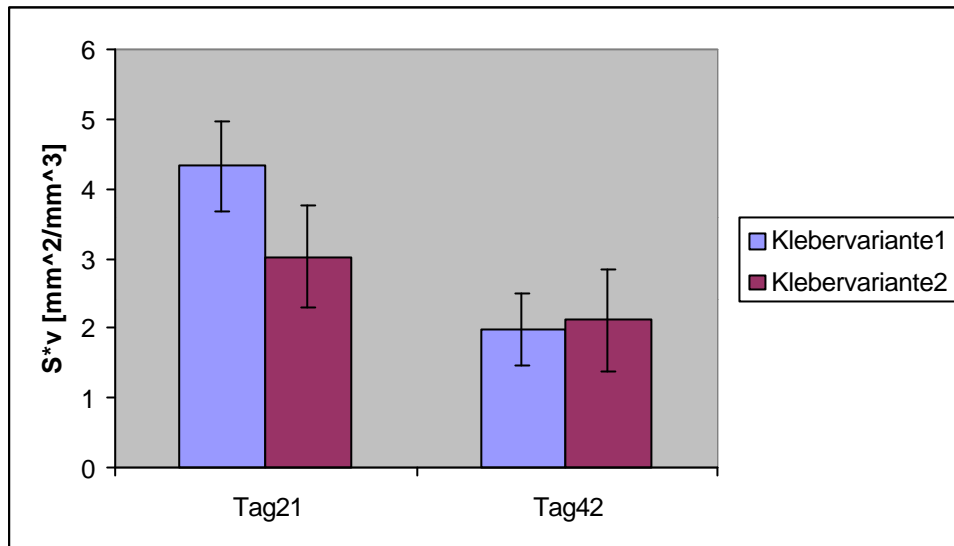


Abb. 52: S\*v der Klebervarianten nach 21 und 42 Tagen.

Ebenfalls nicht signifikant war der Unterschied der beiden Klebervarianten nach 42 Tagen ( $p=0,09$ ), obwohl auch hier der Mittelwert der Klebervariante 2 doppelt so groß war wie der der Klebervariante 1. Dabei konnte man ein Ergebnis von  $8,94 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$  für die Klebervariante 1 und eines von  $15,33 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$  für die Klebervariante 2 beobachten.

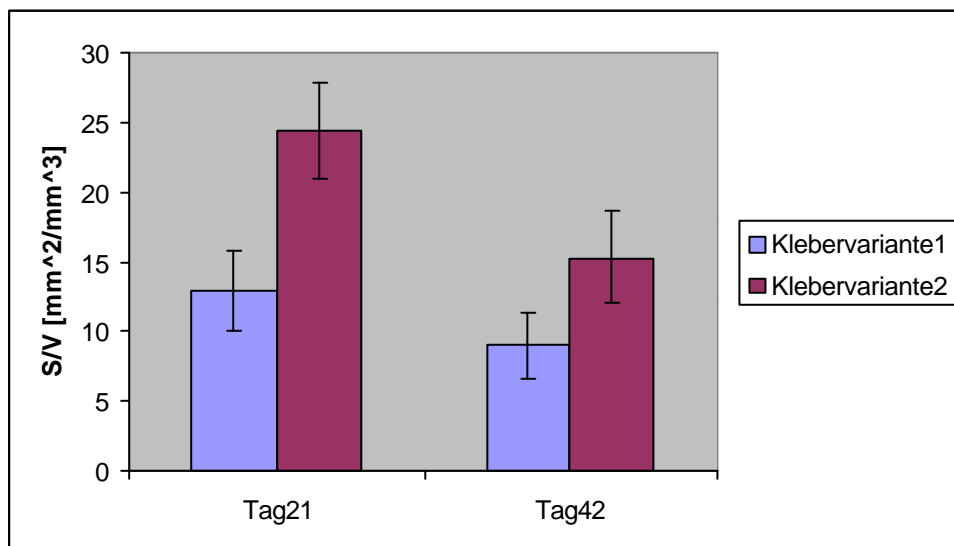


Abb. 53: S/V der Klebervarianten nach 21 und 42 Tagen.

Für den Parameter MTPT ließen sich am 21. Tag keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Klebervarianten feststellen ( $p=0,13$ ) (Abb. 54). Dabei wies die Klebervariante 1 mit  $166,31 \mu\text{m}$  einen fast 1,4fach höheren Mittelwert auf als die Klebervariante 2 mit  $119,30 \mu\text{m}$ .

Die Ergebnisse nach 42 Tagen differierten ebenso nicht signifikant ( $p=0,12$ ). Die Mittelwerte der beiden Klebervarianten unterschieden sich um den Faktor 1,3. Dabei betrug das Ergebnis für die Klebervariante 1 247,89  $\mu\text{m}$  und für die Klebervariante 2 190,82  $\mu\text{m}$ .

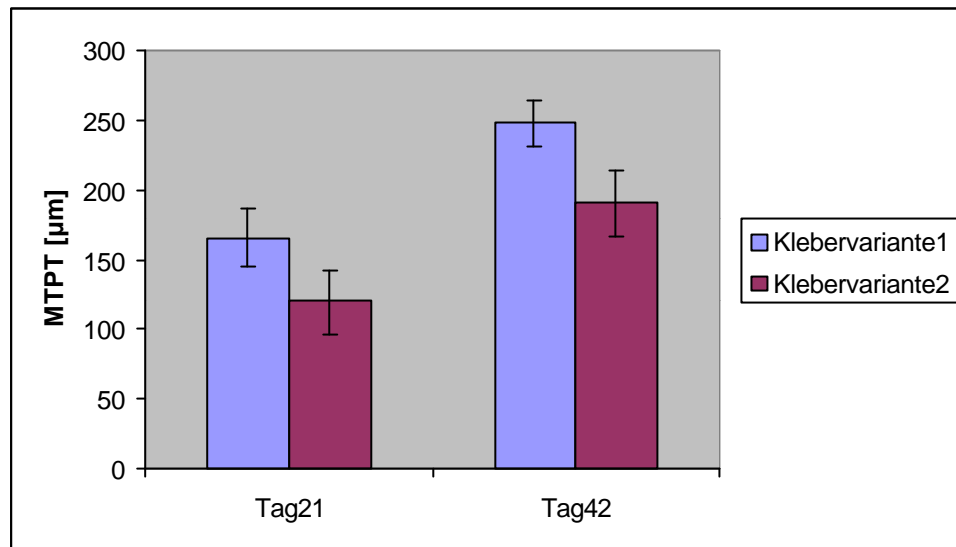


Abb. 54: MTPPT der Klebervarianten nach 21 und 42 Tagen.

Am 21. Tag betrug der Mittelwert des Parameters MTPD für die Klebervariante 1 2,17  $\text{mm}^{-1}$  und lag damit 1,5fach über dem für die Klebervariante 2 mit 1,51  $\text{mm}^{-1}$  (Abb. 55). Diese Differenz war jedoch nicht signifikant ( $p=0,34$ ).

Fast identische Mittelwerte der beiden Klebervarianten konnten nach 42 Tagen gefunden werden. Der Mittelwert der Klebervariante 1 lag bei 0,99  $\text{mm}^{-1}$ , der der Klebervariante 2 bei 1,05  $\text{mm}^{-1}$ . Es konnten dabei keine Signifikanzen ermittelt werden ( $p=0,85$ ).

Trotz viermal so hohen Werten für MTPS bei der Klebervariante 2 im Vergleich mit der Klebervariante 1, konnten diese Unterschiede nicht als signifikant bezeichnet werden ( $p=0,25$ ) (Abb. 56). Dabei wies die Klebervariante 1 ein Ergebnis von 442,00  $\mu\text{m}$  auf und die Klebervariante 2 eines von 1870,62  $\mu\text{m}$ .

Auch nach 42 Tagen konnte man keine signifikanten Unterschiede finden ( $p=0,69$ ). Der Mittelwert für die Klebervariante 2 von 3336,90  $\mu\text{m}$  lag dabei fast 1,5fach über dem der Klebervariante 1 mit 2274,11  $\mu\text{m}$ .

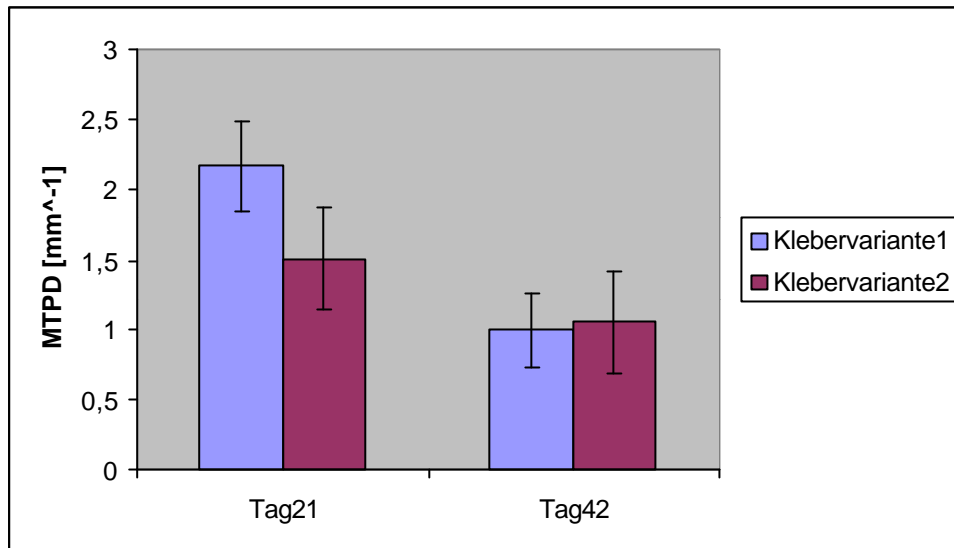


Abb. 55: MTPD der Klebervarianten nach 21 und 42 Tagen.

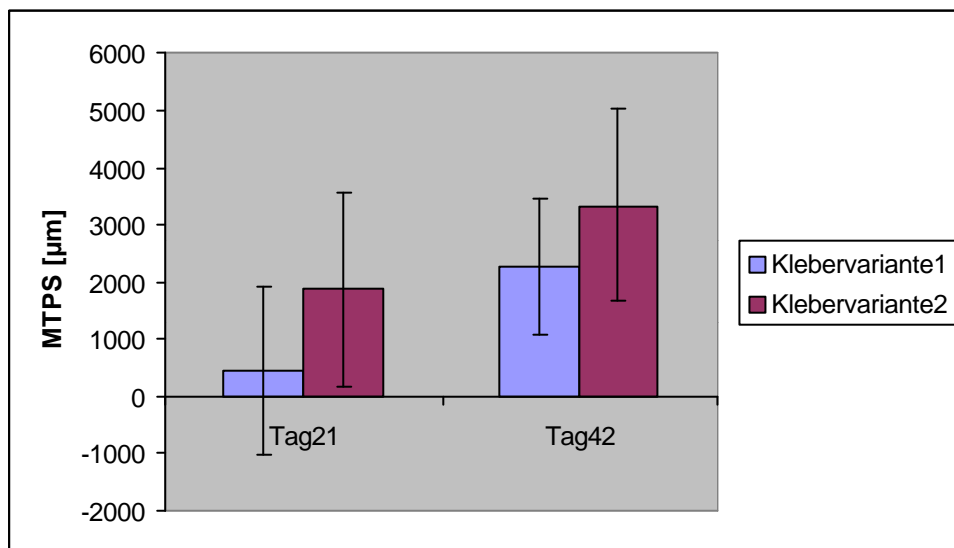


Abb. 56: MTPS der Klebervarianten nach 21 und 42 Tagen.

Für Marrow Space Star Volume lag das Ergebnis am 21. Tag für die Klebervariante 1 mit 0,12 mm<sup>3</sup> 1,5mal höher als das der Klebervariante 2 mit 0,08 mm<sup>3</sup> (Abb. 57). Doch war diese Differenz nicht als signifikant zu werten ( $p=0,34$ ).

Relativ dicht beieinander lagen die Mittelwerte der beiden Klebervarianten nach 42 Tagen. Dabei ließ sich auch kein signifikanter Unterschied beobachten ( $p=0,62$ ). Es konnte ein Ergebnis von 0,34 mm<sup>3</sup> bei der Klebervariante 1 und eines von 0,27 mm<sup>3</sup> bei der Klebervariante 2 festgestellt werden.

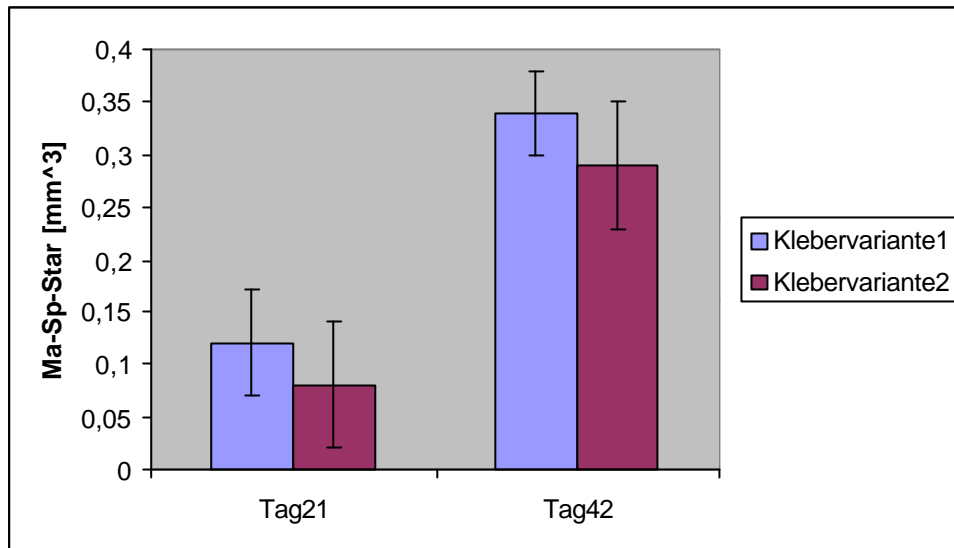


Abb. 57: Marrow Space Star Volume der Klebervarianten nach 21 und 42 Tagen.

Abschließend kann man feststellen, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Klebervarianten zu verzeichnen gab. Vor allen Dingen nach 42 Tagen lagen auch die Mittelwerte der beiden Klebervarianten größtenteils dicht beieinander.

Nach 21 Tagen sind die Unterschiede der Mittelwerte doch etwas deutlicher. Die Parameter der Klebervarianten differieren hier um den Faktor 1,5 bis 2, bei dem Parameter MTPS sogar um Faktor 4.

## 4. Diskussion

Knochen hat als einziges Gewebe im menschlichen Körper die besondere Fähigkeit Defekte ohne Narbengewebe und mit Herstellung der originären Struktur zu heilen.

Man unterscheidet zwei Arten von Knochen, die sich durch den unterschiedlichen Aufbau ihrer Struktur unterscheiden: Lamellenknochen, der im erwachsenen Körper fast ausschließlich zu finden ist, und Geflechtknochen, der meist bei der Knochenneubildung anfällt und größtenteils in Lamellenknochen umgewandelt wird.

Auch bei der Frakturheilung gibt es zwei Formen, die Primär- und die Sekundärheilung. Dabei findet sich die Primärheilung bei stabiler osteosynthetischer Versorgung mit weitgehend exakter Reposition der Frakturrenden. Die Sekundärheilung verläuft über die Zwischenstufe eines Kallus, der aus Bindegewebe und Knorpel besteht. Diese Art der Frakturheilung läuft bei nicht ausreichender Stabilität und Reposition der Fraktur ab.

Zur Vereinfachung und schonenden Versorgung von Frakturen versucht man schon seit einiger Zeit einen bioresorbierbaren Knochenkleber zu entwickeln, der eine Alternative zu klassischen osteosynthetischen Verfahren sein könnte. Interessant ist der Einsatz eines solchen Klebers vor allen Dingen bei der osteosynthetischen Versorgung von Kleinfragmenten oder Trümmerfrakturen. Ein Knochenkleber bietet den Vorteil, dass eine Zweitoperation überflüssig wird, und die Erstoperation schonender abläuft. Außerdem können kleine Knochenfragmente und osteolytische oder osteoporotische Knochenfrakturen besser versorgt werden. Des Weiteren verbleibt nach der Degradation des Knochenklebers kein Fremdmaterial im Körper.

Es konnte jedoch bisher kein Knochenkleber gefunden werden, der eine Alternative zu klassischen osteosynthetischen Verfahren darstellt, da er entweder nicht genügend Adhäsionskräfte oder keine ausreichende Biokompatibilität besaß. Nur PMMA als Knochenzement und vereinzelt andere Kleber werden im klinischen Alltag verwendet. PMMA findet vor allen Dingen bei der Verankerung von Prothesen und der Versorgung von osteolytischen oder osteoporotischen Knochen Verwendung.

Bei der experimentellen Untersuchung von Knochenwachstum und -struktur wird oftmals die Knochenhistomorphometrie eingesetzt. Hiermit ist es möglich, möglichst objektiv und quantitativ an histologischen Präparaten den Knochenaufbau und -umbau zu untersuchen. Es können sowohl zu zwei-, als auch zu dreidimensionalen Strukturparametern Aussagen getroffen werden. Mit Hilfe der

Knochenhistomorphometrie kann somit auch die knöchernen Durchbauung neuartiger Knochenkleber mit geringem Zeitaufwand objektiv und quantitativ beurteilt werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte histomorphometrisch die Osteogenese im Osteotomiespalt der Femurkondyle des Kaninchens nach Applikation von zwei neuen resorbierbaren und degradierbaren Knochenklebervarianten im Vergleich zur Kontrollgruppe untersucht werden. Dabei wurde ein standardisiertes Osteotomiemodell am Kaninchen gewählt, wobei die Tiere nach 7, 21, 42 und 84 Tagen euthanasiert wurden. Die beiden Knochenklebervarianten basierten auf einer Ethylenglykol-oligolactid-dimethacrylat (ELAMA)-Verbindung und unterschieden sich durch die zugesetzten Comonomere.

Zur Untersuchung der knöchernen Durchbauung des Osteotomiespalts nach 21 und 42 Tagen kam die Knochenhistomorphometrie zum Einsatz. Damit sollte eine besonders untersucherunabhängige und zeitsparende quantitative Beurteilung der knöchernen Durchbauung des Osteotomiespalts möglich sein.

## 4.1 Material und Methoden

Bei der Operation wurde unifemoral eine standardisierte Osteotomie an der lateralen Femurkondyle eines Kaninchens durchgeführt. Die Frakturheilung verläuft beim Kaninchen in ähnlicher Weise wie beim Menschen, nur wesentlich schneller. So sind die meisten Vorgänge der Heilung schon nach 6 Wochen abgeschlossen (Wissing et al., 1990). Da beim Menschen in Anlehnung an die 3 Typen der monokondylären Femurfraktur die laterale am häufigsten auftritt und sich dieses ausgewählte Osteotomiemodell als erprobt und etabliert zeigt, wurde die laterale Femurkondyle der Kaninchen abgesetzt (Ostermann et al., 1994, Wissing et al., 1990). Der abgesetzte Teil der Kondyle wurde in der Kontrollgruppe und bei der Klebervariante 1 mit zwei Kirschnerdrähten wieder refixiert. Da die Tiere nach der Operation die Beine sofort wieder belasteten, die Fixationsmethode aber nur übungsstabile Verhältnisse gewährleistete, zeigte sich, dass mit den beiden Kirschnerdrähten keine ausreichende Stabilität gegeben war. Zudem war die erzielte Kompression auf den Osteotomiespalt unzureichend. Somit entschloss man sich für die Klebervariante 2 nur noch einen Kirschnerdraht, dafür aber zusätzlich eine kanülierte Titan-Schraube als Zugschraube zu verwenden. Damit sollte eine höhere Kompression auf den Osteotomiespalt ausgeübt werden. Jedoch wurden auch hierbei keine

belastungsstabilen Verhältnisse erzielt. Zwar wurde bei der Klebervariante 2 durch die Zugschraube eine stärkere Kompression auf den Osteotomiespalt erreicht, doch durch die Verwendung einer anderen Fixationsmethode, ist die Vergleichbarkeit der Klebervariante 2 zu der Kontrollgruppe und der Klebervariante 1 gemindert worden.

Ein wesentlicher Faktor, der die Ergebnisse beeinflusste, war das unterschiedliche Ausmaß der Osteotomiezone, deren Breite doch von Präparat zu Präparat und auch innerhalb eines Tieres stark variierte. Im Besonderen unterschied sich die Breite des Osteotomiespalt zwischen den nach 21 Tagen und den nach 42 Tagen euthanisierten Tieren. Bei den Letzteren war ein deutlich breiterer Spalt zu erkennen und auch quantifizierbar im Vergleich zu der 21-Tage Gruppe.

Die Tiere belasteten die operierten Beine sofort wieder nach der Operation, obwohl keine belastungsstabilen Verhältnisse durch die Operation erzielt wurden. Die Unterschiede scheinen durch die doppelt so lange Belastungszeit der 42-Tage Tiere im Vergleich mit den 21-Tage Tieren hervorgerufen zu werden. Bei der Kontrollgruppe und der Klebervariante 1 spielt sicherlich zusätzlich auch die alleinige Fixation mit zwei Kirschnerdrähten eine Rolle. Jedoch zeigten auch die Osteotomiespaltbreiten der Klebervariante 2, die zusätzlich mit einer Zugschraube fixiert wurde, nach 42 Tagen deutlich größere Spaltmaße als nach 21 Tagen. Durch die bei der histomorphometrischen Auswertung in den Osteotomiespalt eingelegten Quadranten konnte die Breite des Osteotomiespalt gemessen werden, wobei hier keine Einheit hinsichtlich der Breite vorhanden war, sondern die Relationen betrachtet werden mussten. So lag die Breite des Osteotomiespalt in der Kontrollgruppe bei der 42-Tage Gruppe im Mittel fast doppelt so hoch wie in der 21-Tage Gruppe. Ein ähnliches Bild ergab sich bei der Gruppe der Klebervariante 2. Auch hier waren die Spaltmaße nach 42 Tagen durchschnittlich doppelt so hoch wie nach 21 Tagen. Bei der Gruppe der Klebervariante 1 war der Unterschied noch extremer. Hier lag der Mittelwert der Osteotomiespaltbreite fast dreimal so hoch in der 42-Tage Gruppe im Vergleich zu der 21-Tage Gruppe. Bei diesen Differenzen liegt ein großes Problem in der Vergleichbarkeit der zu unterschiedlichen Zeitpunkten euthanisierten Tiere. Genauso problematisch zeigte sich damit die Vergleichbarkeit der Klebervariante 1 mit der Kontrollgruppe nach 42 Tagen. Wo die Spaltbreite nach 21 Tagen in beiden Gruppen noch fast gleich waren, differierten die Breiten nach 42 Tagen doch eindeutig. So war der Osteotomiespalt bei der Klebervariante 1 durchschnittlich fast doppelt so breit wie in der Kontrollgruppe.



Das gleiche Problem stellt sich bei dem Vergleich der beiden Kleber. So ist der Vergleich der beiden 21-Tage Gruppen noch ganz gut möglich, da sich hier die Spaltbreiten nur gering unterschieden. Anders sieht das bei dem Vergleich der beiden Gruppen nach 42 Tagen aus. Dabei war die Spaltbreite bei der Klebervariante 1 im Durchschnitt fast doppelt so breit wie bei der Klebervariante 2.

Diese Problematik der Osteotomiespaltbreite ergab sich bei dem Vergleich der Schnitte und Felder miteinander nicht. Die miteinander verglichenen Messfelder hatten, da sie in ein und demselben Präparat lagen und bedingt durch das Einlegen der gleich großen Messfeldquadranten, immer die gleichen Breiten. Die miteinander verglichenen Längsschnitte stammten jeweils von dem gleichen Tier, lagen aber nicht im gleichen Präparat. Trotzdem hielten sich die Unterschiede im minimalen Bereich, sowohl nach 21 Tagen, als auch nach 42 Tagen.

Bei den verwendeten Präparaten ergab sich das Problem, dass die Färbungsmethoden, Toluidinblau, Levai-Laczko und van Gieson, für die histomorphometrische Auswertung nicht als die optimalen Methoden anzusehen sind. Als die Standardfärbung für die Histomorphometrie bei knöchernen Strukturen hat sich die von Kossa- Färbung erwiesen. Die verwendeten Präparate wurden jedoch ursprünglich für eine qualitative Bewertung der Femurkondylen unter dem Lichtmikroskop hergestellt und deshalb mit den genannten Färbungen bearbeitet. Durch die nachträgliche Kontrastverschärfung am Computer konnten jedoch vermeintliche Unterschiede der verschiedenen Färbungen ausgeglichen und eine Kontrastierung wie bei vergleichbaren von Kossa- gefärbten Präparaten erreicht werden.

Als problematisch könnte diese Nachbearbeitung der Präparate am Computer angesehen werden, doch ist hierzu zu sagen, dass es sich um eine interaktive Nachbearbeitung handelt. Der Untersucher kann unter lichtmikroskopischer Kontrolle am Originalpräparat die Artefakte ohne Schwierigkeiten erkennen (Abb. 20). Eine signifikante Beeinflussung der Ergebnisse ist hiermit nahezu ausgeschlossen. Des Weiteren gilt es zu bedenken, dass dieser Bearbeitungsschritt immer von derselben Person durchgeführt wurde.

Werden die Untersuchungen an ein und demselben Präparat von unterschiedlichen Untersuchern vorgenommen, so kann sich ein signifikanter Unterschied der Ergebnisse einstellen. Wird diese Untersuchung jedoch von derselben Person

durchgeführt, so entstehen reproduzierbare Ergebnisse ohne signifikante Abweichungen (Compston et al., 1986).

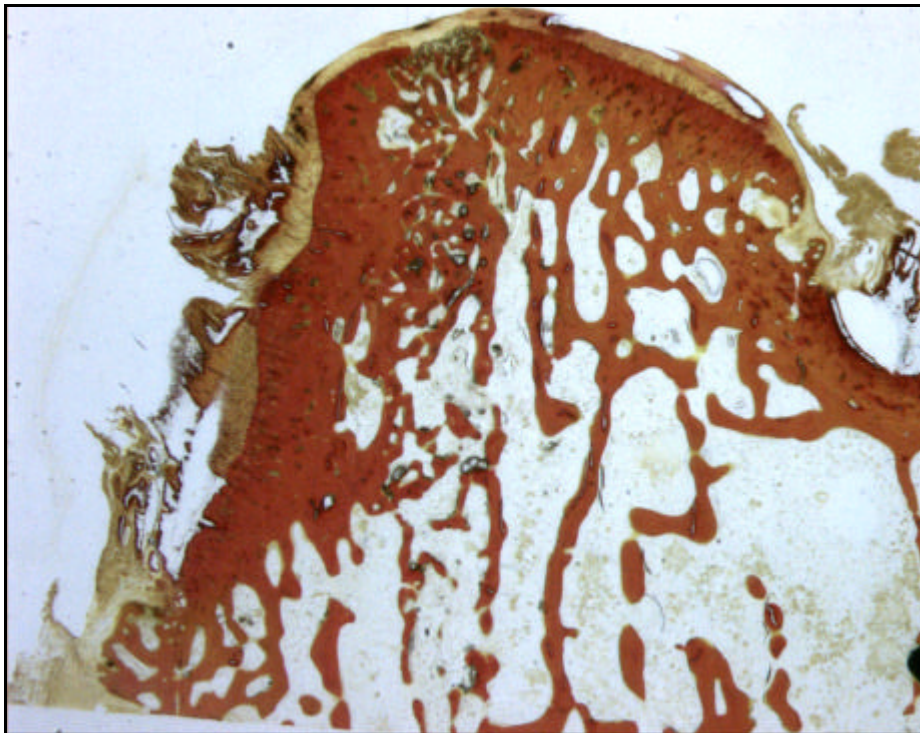


Abb. 20: Nach van Gieson gefärbtes Originalpräparat eines 42-Tage Präparates der Kontrollgruppe zur lichtmikroskopischen Kontrolle der Nachbearbeitung und der korrekten Einlage der Messfeldquadranten.

Als ebenfalls untersucherabhängig erweist sich das Einlegen der Messfeldquadranten in den Osteotomiespalt, da hierbei oftmals keine eindeutige Begrenzung des Osteotomiespalt auszumachen war. Doch wurde auch hier unter lichtmikroskopischer Kontrolle am Originalpräparat gearbeitet. Außerdem wurden, ebenso wie bei der Nachbearbeitung, alle Arbeiten von ein und demselben Untersucher unternommen. Dadurch sind die Fehler so weit wie möglich reduziert worden.

Der rechteckige Auswertungsbereich erwies sich oftmals als problematisch, wenn das distale oder proximale Ende des Osteotomiespalt nicht gerade abschloss, sondern gekrümmt war. Befand sich ein Kirschnerdraht im Präparat ergab sich ein ähnliches Problem, da dieser ebenfalls eine Krümmung aufwies. Daher wurden entweder, bei kleiner gewähltem Messfeldquadranten, knöcherne Anteile vernachlässigt, oder es ging, bei größerem Quadranten, knochenleere Fläche in die Auswertung mit ein. In der vorliegenden Arbeit wurde der kleinere

Auswertungsbereich verwendet. Hierdurch ging der außerhalb des Quadrates liegende Knochen verloren (Abb. 21).

Weiterhin lagen die Osteotomiespaltenden im gelenknahen Kondylenbereich nicht genau parallel, was ebenfalls zu der Frage der Begrenzung des Auswertungsbereiches führte. Hier wurde der jeweils tiefer liegende Teil des Osteotomiespaltes als Grenze gewählt, da nur bis dorthin an beide Seiten der Osteotomiezone originärer Knochen heranreicht. Dadurch ging auch hier teilweise der darüber liegende Knochen verloren (Abb. 21).

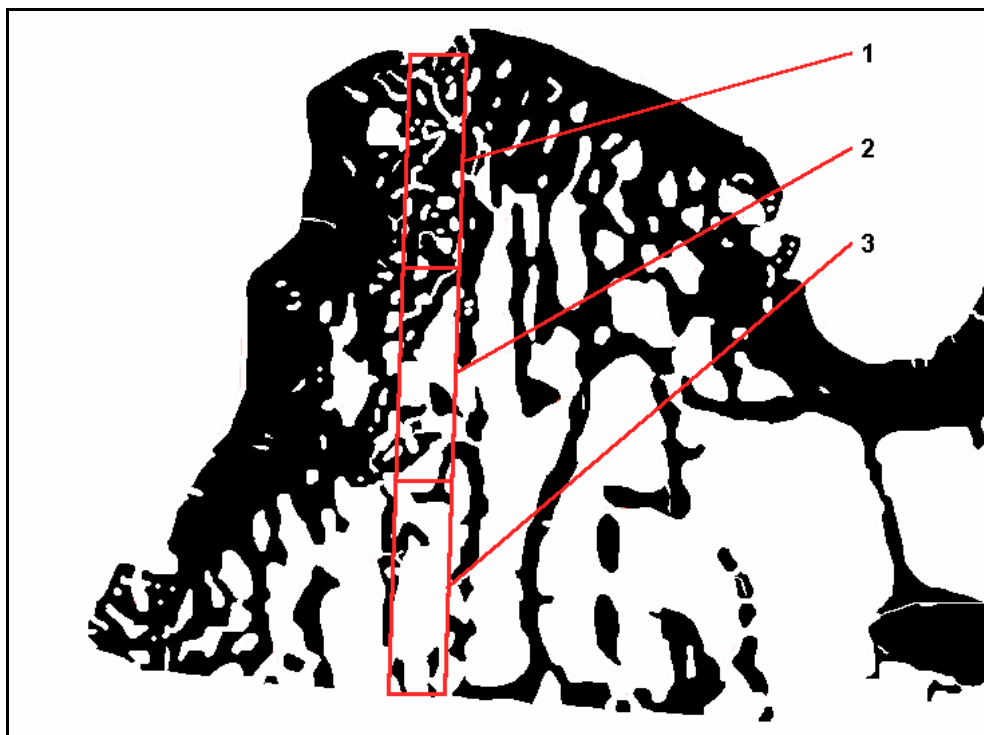


Abb. 21: Einteilung der Messfeldquadranten bei einem 42-Tage Präparat der Kontrollgruppe.

Für die histomorphometrische Auswertung konnten nicht alle vorhandenen Präparate genutzt werden. So fielen die 7- und 84-Tage Präparate aus der Untersuchung heraus und wurden auch für die 2. Serie mit der Klebervariante 2 gar nicht mehr angefertigt.

Bei der 7-Tage Gruppe zeigten sich schon lichtmikroskopisch keinerlei knöcherne Bestandteile im Osteotomiespalt, sowohl bei der Kontrollgruppe, als auch bei der Klebervariante 1, so dass eine histomorphometrische Auswertung keinen Sinn gemacht hätte (Abb. 15).

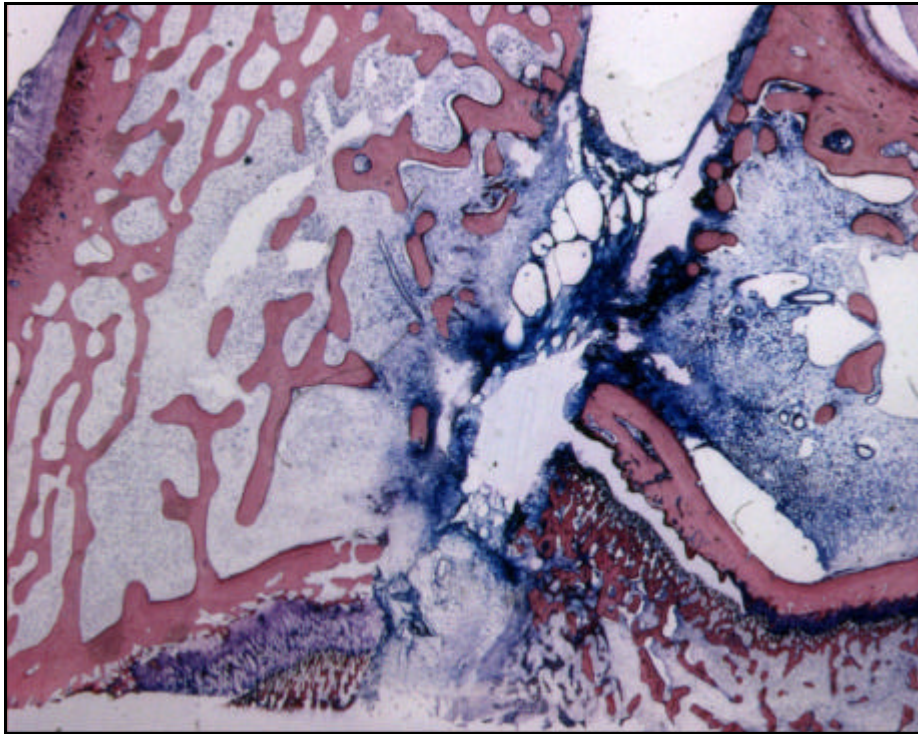


Abb. 15: 7-Tage Präparat der Klebergruppe ohne knöchernes Wachstum im Frakturspalt.

Auch die 84-Tage Gruppe wurde nicht für die histomorphometrische Auswertung herangezogen. Hier zeigte sich lichtmikroskopisch eine komplette knöcherne Durchbauung des Osteotomiespalts, womit eine klare Abgrenzung des Osteotomiespaltes und damit auch die Festlegung eines Auswertungsbereiches nicht mehr möglich war (Abb. 16).

Es konnten von den 21- und 42-Tage Präparaten ebenfalls nicht alle untersucht werden, da sich bei einigen Präparaten ein zu schmaler Frakturspalt zeigte (Abb. 17). Dabei war es nicht möglich den rechteckigen Auswertungsbereich so innerhalb des Osteotomiespalts zu platzieren, dass keine ursprünglichen knöchernen Strukturen mit in die Auswertung einfließen. Somit ist es auch zu erklären, dass bei den Längsschnitten nicht genügend Präparate für die Auswertung der dorsalen Schnittebene zur Verfügung standen.

Darin liegt auch ein großes Problem für die statistische Analyse, da nur eine geringe Anzahl von Präparaten (Beobachtungsobjekte) zur Verfügung stand, die für die Auswertung genutzt werden konnten. Jedoch kann man davon ausgehen, dass wenn bei einer geringen Präparatanzahl ein signifikanter Unterschied zu ermitteln ist, so ist dieser Unterschied meist überzeugend und lässt sich auch mit einer größeren Anzahl von Präparaten bestätigen. Umgekehrt kann man nicht davon ausgehen, dass Ergebnisse, die nicht signifikant differieren, dies auch bei einer größeren Anzahl von



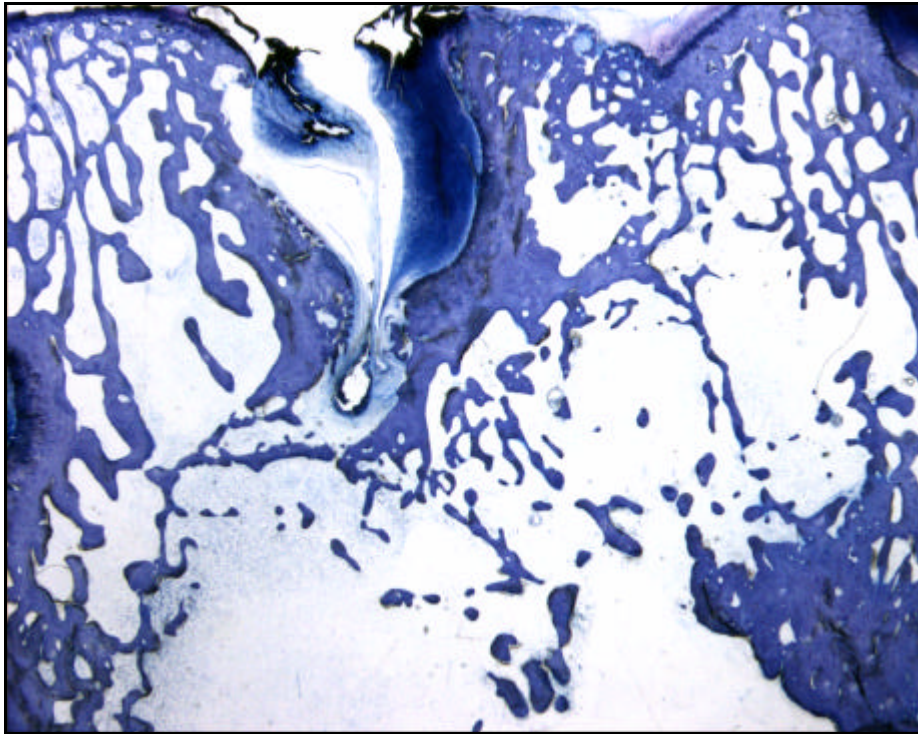


Abb. 16: 84-Tage Präparat der Klebvariante 1 mit kompletter Durchbauung des Frakturspalt.

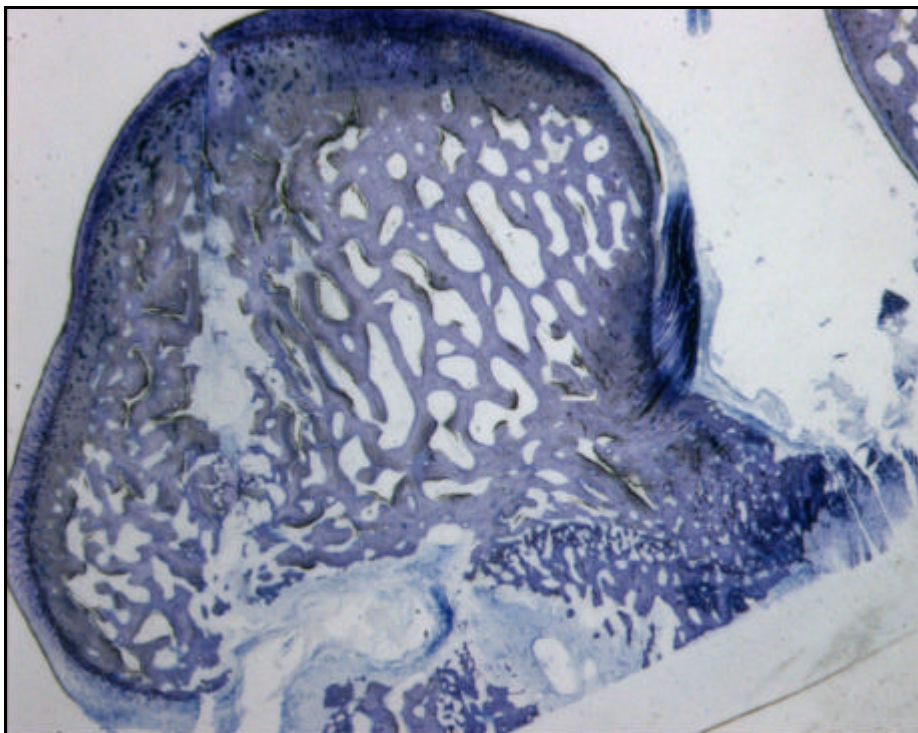


Abb. 17: 21-Tage Präparat der Kontrollgruppe mit zu schmalen Frakturspalt für die Auswertung.

Präparaten nicht tun. Man muss eher davon ausgehen, dass größere Unterschiede der Mittelwerte, die bei einer geringen Präparatanzahl nicht signifikant sind, bei einer

größeren Präparatanzahl signifikant werden. Somit besteht bei einer geringen Anzahl von Beobachtungsobjekten die große Gefahr von falsch negativen Ergebnissen, so dass man einen vorhandenen Unterschied unter Umständen nicht erkennt (Stapff, 2004).

Auf Grund der histologischen Ergebnisse der Dissertationsarbeit von Hahn (in Vorbereitung) wurde der Vergleich der Klebervariante 2 mit der Kontrollgruppe nicht mehr unternommen. Die rein qualitative lichtmikroskopische Betrachtung zeigte, dass die Klebervariante 2 eine starke Barriere für das knöcherne Wachstum im Osteotomiespalt bildet und teilweise sogar zelltoxisch ist. In vielen Präparaten zeigte sich keinerlei knöcherne Struktur, sondern nur Knochenkleber in dem Osteotomiespalt (Abb. 58).

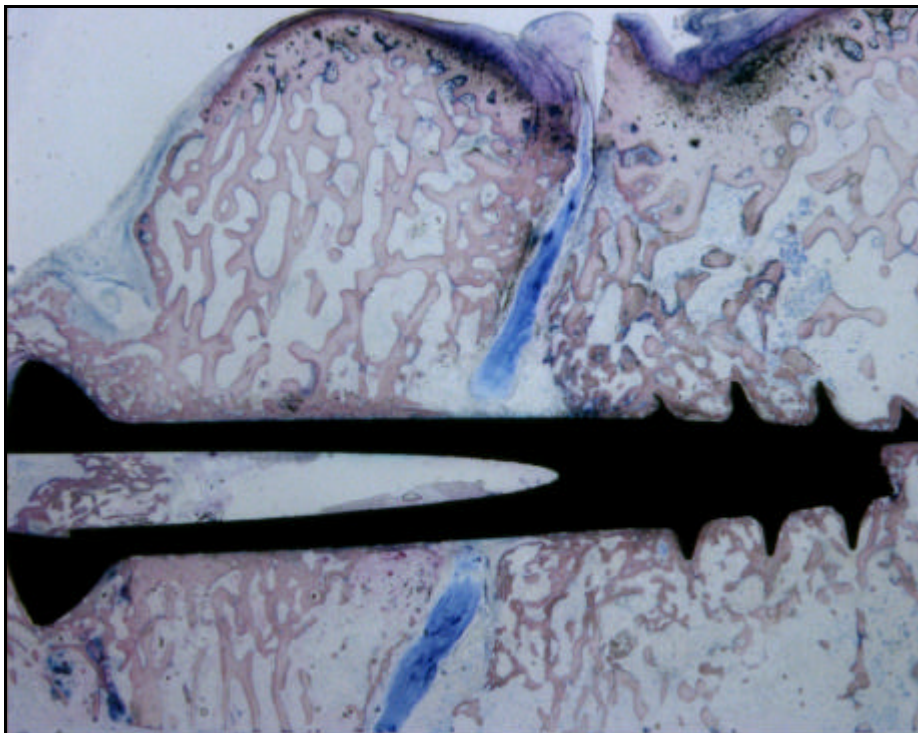


Abb. 58: 42-Tage Präparat der Klebervariante 2 ohne knöcherne Elemente im Frakturspalt.

Somit waren bei einem histomorphometrischen Vergleich der Klebervariante 2 mit der Kontrollgruppe keine sinnvollen Ergebnisse zu erwarten gewesen. Deshalb wurde der alleinige Vergleich der Klebervariante 1 mit der Kontrollgruppe unternommen.

Die Methode der Histomorphometrie bietet selber auch einige Nachteile. So lassen sich mittels Histomorphometrie nur statische Zustände beschreiben, jedoch keine

dynamischen Vorgänge beobachten. Es ist lediglich möglich, wie in der vorliegenden Arbeit geschehen, durch unterschiedliche Beobachtungszeitpunkte dynamische Vorgänge teilweise zu beschreiben. Des Weiteren ist nach der Kontrastierung keine Differenzierung unterschiedlicher Zelltypen möglich. Somit fällt die Unterscheidung zwischen originärem und neu gebildetem Knochen schwer und ist nur durch die Kontrolle am Originalpräparat möglich (Abb. 20). Innerhalb der einzelnen Messfeldquadranten erfolgt keine Differenzierung der Osteogenese in verschiedenen Bereichen, sondern es werden Durchschnittswerte über das ganze Messfeld gebildet. So können eventuell histologisch erkennbare Unterschiede innerhalb eines Messfeldquadranten histomorphometrisch nicht bestätigt werden.

## **4.2 Ergebnisse**

Mit dieser Arbeit sollte die knöcherne Durchbauung in verschiedenen Abschnitten im Osteotomiespalt des Kaninchens nach Kleberapplikation histomorphometrisch untersucht werden. Außerdem wurden die beiden Knochenklebervarianten miteinander und die Klebervariante 1 zusätzlich mit der unbehandelten Kontrollgruppe verglichen.

Es wurde zuerst der Unterschied zwischen dem 21. und 42. Tag der Kontrollgruppe histomorphometrisch untersucht. Zu erwarten gewesen wäre hier ein stärkeres knöchernes Wachstum nach 42 Tagen im Vergleich zur 21-Tage Gruppe.

Erstaunlicherweise zeigten sich jedoch beim Volumenanteil keine Differenzen zwischen den beiden Tagen. Dafür stellten sich aber bei anderen Parametern signifikante bis hoch signifikante Unterschiede heraus. So stellte sich der Knochen im Osteotomiespalt nach 21 Tagen wesentlich weniger trabekuliert dar als am 42. Tag. Er zeigte sich außerdem deutlich poröser.

Diese Aussagen lassen sich fast vollständig auf den Vergleich der beiden Beobachtungstage bei den mit Knochenkleber behandelten Kaninchen übertragen. Bei der Klebervariante 1 war der Knochen auch hier nach 21 Tagen signifikant poröser und weniger trabekuliert, als bei den nach 42 Tagen euthanasierten Tieren. Als Unterschied stellte sich aber heraus, dass nach 21 Tagen sogar mehr knöcherne Anteile im Osteotomiespalt vorhanden waren als in der Gruppe nach 42 Tagen.

In ähnlicher Weise verhält es sich bei der Klebervariante 2. Der Knochen im Osteotomiespalt zeigte auch hier nach 21 Tagen eine erhöhte Porosität im Vergleich zu dem Knochen nach 42 Tagen. Ebenfalls konnte eine nicht so starke trabekuläre Vernetzung nach 21 wie nach 42 Tagen gesehen werden. Dagegen war hier jedoch das knöcherne Volumen nach 42 Tagen höher als nach 21 Tagen. Allerdings lag dieser Unterschied im minimalen Bereich und kann gerade bei der geringen Präparatanzahl ( $n=3$ ) nicht als aussagekräftig gelten. Allgemein ist für die Klebervariante 2 zu sagen, dass für alle gemessenen Werte keine signifikanten Differenzen zwischen den beiden Tagen aufgezeigt werden konnten.

Dieses Ergebnis war so vorher nicht zu erwarten gewesen. Als Erklärung kann man sich vorstellen, dass am 21. Tag Geflechtknochen im Osteotomiespalt gebildet wurde, der sich zum 42. Tag hin immer mehr zu Lamellenknochen umgewandelt hat (Willenegger et al., 1971, Frisch und Bartl, 1999). Die Struktur von Geflechtknochen stellt sich im Vergleich zu Lamellenknochen weit weniger dicht und dafür poröser dar (Junqueira und Carneiro, 1996).

Eine weitere Erklärung für die Ergebnisse ist die Breite des Osteotomiespalt. Dieser war nach 42 Tagen deutlich breiter. Das gilt sowohl für die Kontrollgruppe, wie auch für die mit der Klebervariante 1 behandelten Tiere. So war der Osteotomiespalt bei der Klebervariante 1 nach 42 Tagen durchschnittlich fast dreimal so breit wie nach 21 Tagen. In der Kontrollgruppe war der Osteotomiespalt im Mittel immerhin noch doppelt so breit. In der Gruppe der Tiere, die mit der Klebervariante 2 behandelt wurden, zeigte sich dieses Problem in gleicher Weise. Auch hier war der Osteotomiespalt nach 42 Tagen durchschnittlich doppelt so breit wie nach 21 Tagen. Es zeigt sich bei einem breiteren Osteotomiespalt eine verzögerte Osteotomieheilung, da die knöcherne Durchbauung einer größeren Osteotomiezone länger dauert (Claes et al., 1998). Außerdem sind in einem breiteren Osteotomiespalt, bei gleichem absoluten Knochenwachstum, in Relation zur Fläche relativ weniger knöcherne Bestandteile zu finden, als in einem schmalen Spalt.

Die histomorphometrisch nicht eindeutig festzustellenden Unterschiede zwischen den beiden Beobachtungstagen sind höchstwahrscheinlich auf die stark differierenden Osteotomiespaltbreiten zurückzuführen. An gleich großen Spaltmaßen könnte sicher eine stärkere Osteogenese nach 42 Tagen verifiziert werden.



Zur Beurteilung der Klebervariante 1 wurde die Osteogenese im Osteotomiespalt mit der unbehandelten Kontrollgruppe verglichen. Nach vorangegangenen Studien, die in den meisten Klebern eher eine Barriere für die Frakturheilung sehen, konnte auch hier eine ähnliche Situation erwartet werden (Giebel und Rimpler, 1981, Müller, 1962).

Jedoch konnte nach 21 Tagen keine signifikante Differenz zwischen der Klebervariante 1 und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Dies gilt für alle gemessenen Parameter. Auch zeigten die Ergebnisse kein vermehrtes Wachstum bei den unbehandelten Tieren. Es konnte im Gegenteil eher ein minimal stärkeres Wachstum bei den mit der Klebervariante 1 behandelten Tieren festgestellt werden. Aus diesen kleinen Differenzen sind aber sicherlich keine weiteren Schlüsse zu ziehen, hinsichtlich einer osteoinduktiven Wirkung der Klebervariante 1. Auf jeden Fall kann nach 21 Tagen nicht von einer Barriere für die Osteogenese durch die Klebervariante 1 gesprochen werden.

Diese Barriere kann eher nach 42 Tagen gesehen werden. Auch am 42. Tag kann für keinen Messwert ein signifikanter Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Tieren aufgezeigt werden. Es lassen sich aber deutliche Differenzen finden, die eben nicht signifikant sind, aber klare Tendenzen zeigen. Mit einer höheren Anzahl von Präparaten könnten diese vielleicht noch deutlicher werden. Bei der unbehandelten Kontrollgruppe stellt sich eine eindeutig stärkere Osteogenese ein als bei den mit der Knochenklebervariante 1 fixierten Osteotomien. Diese Beobachtung bestätigt in gewisser Weise die in anderen Studien gemachten Aussagen, dass der Kleber die Osteogenese behindert (Giebel und Rimpler, 1981, Müller, 1962).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Klebervariante 1 keine Barriere für die knöcherne Durchbauung des Osteotomiespalts darstellt, was an den Daten vom 21. Tag abgelesen werden kann, die keine Unterschiede zu den Werten der Kontrollgruppe zeigen. Nachdem der knöcherne Wachstumsprozess sich dann in den Kleber fortgesetzt hat, wird das weitere Voranschreiten der knöchernen Bestandteile durch die langsame Degradation des Klebers behindert. Dieses könnte man dann an den Werten nach 42 Tagen festmachen, die zeigen, dass die Osteotomieheilung der mit Kleber fixierten Kondylen hinter der Osteogenese der Kontrollgruppe zurückbleibt. Die Degradation des Klebers benötigt *in vitro* 30 Wochen (Hahn, in Vorbereitung). Die Durchbauung des Osteotomiespalts ist jedoch,

wie die histologischen Untersuchungen zeigen nach 84 Tagen weitestgehend abgeschlossen. Somit benötigt die Degradation zumindest *in vitro* länger als die Osteogenese des Osteotomiesplats *in vivo*.

Eine ganz andere und auch einleuchtender erscheinende Erklärung bietet wieder die Breite des Osteotomiespaltes. Während nach 21 Tagen die Spaltbreiten der Klebervariante 1 und der Kontrollgruppe noch fast identisch sind, stellt sich die Situation nach 42 Tagen stark verändert dar. Hier ist der Osteotomiespalt in der Klebergruppe durchschnittlich fast doppelt so breit wie bei der Kontrollgruppe. Somit muss ein wesentlich größerer Spalt knöchern überbrückt werden, was länger dauert (Claes et al., 1998). Außerdem finden sich pro Flächeneinheit weniger knöcherne Bestandteile.

Mit Hilfe der histomorphometrischen Analyse der Osteogenese wurden drei Messfeldquadranten (1. gelenknah; 2. zentral; 3. gelenkfern) innerhalb eines Osteotomiespaltes miteinander verglichen.

Nach 21 Tagen zeigte sich kein signifikanter Unterschied bei dem Vergleich der einzelnen Felder miteinander. Auch sonst gab es keine besonderen Auffälligkeiten, die bedeutungsvoll oder näher zu interpretieren wären. Somit kann auch nicht auf bestimmte Tendenzen geschlossen werden. Dies gilt für alle hier untersuchten Parameter. Es zeigte sich also keine besondere Lokalisation im Osteotomiespalt an der das Wachstum vermehrt voranschreitet, auch wenn West (West et al., 1996) mittels Histomorphometrie zeigte, dass der periostale Bereich eine größere Wachstumspotenz besitzt als der endostale Bereich. Dieses müsste in der vorliegenden Arbeit heißen, dass das Wachstum im 1. Feld im Vergleich mit den Feldern 2 und 3 gesteigert ist. Dafür gibt es aber keine Anzeichen.

Ein anderes Bild ergibt sich am 42. Tag. Hier zeigte sich bei dem Vergleich der Felder 2 und 3 kein signifikanter Unterschied bei allen vorliegenden Parametern. Es scheint jedoch das Wachstum im 2. Feld leicht vermehrt, doch liegt dieses Ergebnis im Zufallsbereich. Anders sieht es aus bei der Gegenüberstellung vom 1. Feld gegen die Felder 2 und 3. Es zeigten sich jeweils signifikante bis hochsignifikante Unterschiede. Das Wachstum ist also im gelenknahen Kondylenbereich, verglichen mit dem gelenkfernen trabekulären Teil, stark vermehrt. Es zeigten sich bei den Parametern, die für die trabekuläre Vernetzung und das knöcherne Wachstum stehen, fast doppelt so hohe Werte im gelenknahen Kortikalisbereich. Der

Kortikalisbereich ist außerdem dichter und weniger porös, dafür aber nicht so stark trabekuliert.

Dieses Ergebnis bestätigt die Ergebnisse von West (West et al., 1996). Dort ergaben sich in Bezug auf die Kallusbildung im periostalen Teil stärkere Wachstumstendenzen als im endostalen Bereich. Denkbar wäre auch eine Lamellenknochenbildung im Kondylenbereich über die Zwischenstufe von Geflechtknochen (Willenegger et al., 1971, Frisch und Bartl, 1999). Geflechtknochen ist im Vergleich mit lamellären Knochen poröser und weit weniger dicht (Junqueira und Carneiro, 1996). Dies würde die unterschiedlichen Ergebnisse nach 21 Tagen (Geflechtknochen im Kondylenbereich) und 42 Tagen (Lamellenknochen im Kondylenbereich) erklären. Außerdem wäre eine Erklärung, dass nach 21 Tagen die Frakturheilung noch nicht in vollem Gange gewesen ist. Schenk sagt, dass bei der Kontaktheilung erst eine Latenzphase auftritt, bevor die eigentlichen Wachstumsvorgänge anlaufen (Schenk, 1978). Die Latenzphase wäre dann nach 42 Tagen überwunden und das zeigt sich im vermehrten Wachstum der Kondylenregion. Jedoch gelten diese Vorgänge für die Kontaktheilung und nicht, wie in diesem Fall, für die Spaltheilung.

Am wahrscheinlichsten ist, dass ganz einfach ein Normalisierungszustand, also die Herstellung der ursprünglichen, physiologischen Struktur vor der Fraktur, eintritt. Parfitt vergleicht das TBV (Knochenvolumen) der Kondylenregion mit dem Markraum im Normalzustand. Hier zeigt sich, dass der Knochen im Kortikalisbereich 80% und im Markraum nur 20% einnimmt (Parfitt, 1983).

Der Vergleich der einzelnen Felder zeigte nach 21 Tagen keinerlei Tendenzen oder Unterschiede, um darüber eine wesentliche Aussage zu treffen. Es scheint anhand der vorliegenden Daten keine Vorzugsrichtung zu geben in der die knöcherne Durchbauung des Osteotomiespalts voranschreitet.

Die Ergebnisse nach 42 Tagen sind wohl am ehesten zu deuten als allmähliche Wiederherstellung des ursprünglichen, physiologischen Knochenaufbaus mit dichter Kortikalis im gelenknahen Kondylenbereich und trabekuliertem Knochen im gelenkfernen Spongiosabereich.

Teil der Untersuchung der Osteotomieheilung war auch festzustellen, ob es Unterschiede im Wachstum zwischen zwei Längsschnitten durch die Kondyle gibt.

Der 2. Schnitt lag dabei immer weiter ventral am Femur als der zentral gelegene 1. Schnitt.

Am 21. Tag zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Schnitten bei allen Parametern. Es konnten nur leicht erhöhte Wachstumsparameter bei dem dorsalen Schnitt festgestellt werden, wobei diese nicht über zu bewerten sind und eher im Zufallsbereich lagen.

Für die Schnitte nach 42 Tagen gestaltete sich das Bild etwas anders. Hier fanden sich bei den ventralen Schnitten eindeutig erhöhte Werte, die für ein verstärktes Wachstum und eine bessere trabekuläre Vernetzung sprechen. Für einige Parameter, vor allen Dingen TBV, Marrow Space Star Volume und MTPT, waren die Werte sogar signifikant verändert.

Bei dem Blick auf die Lage der Schnittebenen zeigt sich, dass die ventralen Schnitte die Kortikalis zweimal schneiden, die zentralen dagegen nur einmal. Zwar fällt der proximale Schnittpunkt aus der Messung heraus, doch sind sicherlich Anteile der Kortikalis noch in die Messung mit eingeflossen. Außerdem liegt der ventrale Schnitt im Ganzen nah an der ventralen Kortikalis der Femurkondyle, wohingegen sich der zentrale Schnitt mitten in dem spongiösen Teil des Femurs befindet (Abb. 9).

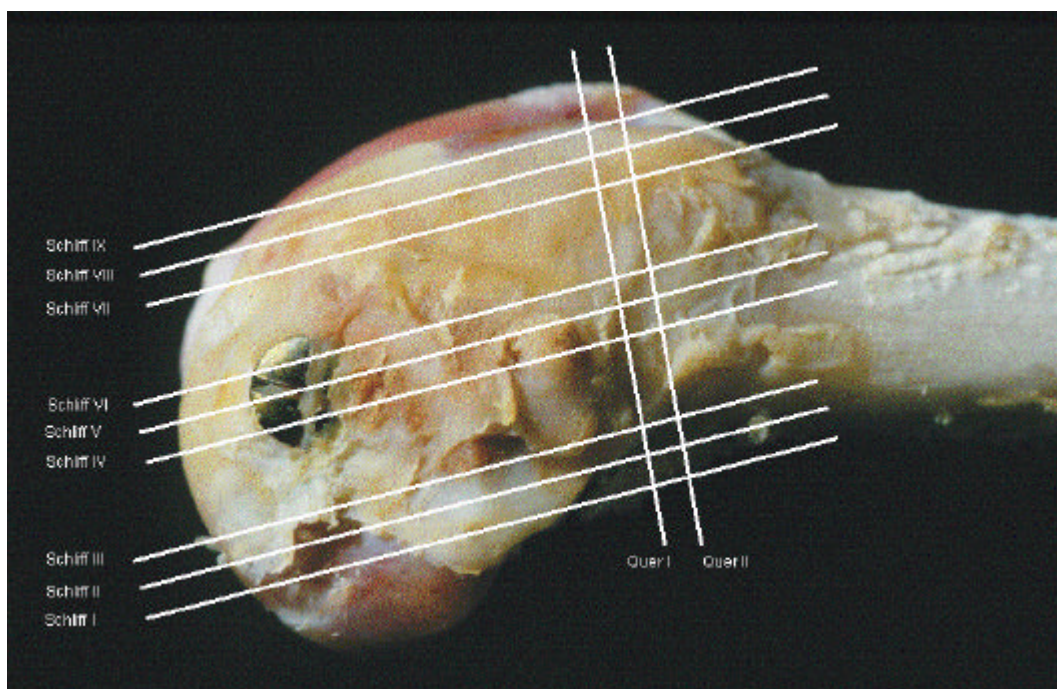


Abb. 9: Einteilung der Schnittebenen - 9 Längsschnitte (I-IX), 2 Querschnitte (Quer I-II).

Wie schon bei der Untersuchung der einzelnen Messfeldquadranten im Osteotomiespalt, bei der sich nach 42 Tagen ein vermehrtes Wachstum im

Kortikalisbereich zeigte, ist die Osteogenese in den kortikalisnahen Bereichen verstärkt (Parfitt, 1983).

Eine weitere mögliche Erklärung für das verstärkte Wachstum in den ventralen Schnitten könnte eine mechanische Mehrbelastung durch den Druck der Patella im ventralen Anteil der Femurkondyle sein (Endler, 1980). Durch diese erhöhten Druckkräfte wird die Frakturheilung gefördert (Meadows et al., 1990).

Die Unterschiede zwischen den beiden Längsschnitten sind am wahrscheinlichsten auf die unterschiedliche Lage und Nähe zur Kortikalis zurückzuführen. Es lagen hier leider nicht genügend Präparate der dorsalen Längsschnitte vor, um diese mit in die Auswertung einzubeziehen. Hier wäre dann ein ähnliches Ergebnis wie in den ventralen Schnitten zu erwarten gewesen. Durch die dorsalen Längsschnitte und ebenfalls durch eine größere Anzahl von Präparaten könnten diese Ergebnisse genauer beurteilt werden.

Als letztes wurde noch ein Vergleich der beiden Klebervarianten unternommen. Und zwar wurden die Kleber jeweils zu identischen Beobachtungstagen miteinander verglichen.

Am 21. Tag zeigte sich bei der Klebervariante 1 im Vergleich mit der Klebervariante 2 ein 1,5fach erhöhter knöcherner Anteil, was für ein erhöhtes Wachstum spricht. Außerdem stellte sich eine wesentlich stärkere Trabekulierung bei der Klebervariante 1 heraus. Dazu war der Knochen der Klebervariante 2 erheblich poröser. Dabei ist zu sagen, dass diese Unterschiede bei keinem der gemessenen Parameter signifikant verändert waren, auch wenn die Mittelwerte deutlich differierten.

Dieses Bild zeigte sich in fast gleicher Weise auch nach 42 Tagen. Auch hier war die Klebervariante 1, verglichen mit der Klebervariante 2, eindeutig stärker trabekuliert. Ebenfalls zeigte die Klebervariante 2 eine wesentlich höhere Porosität als die Klebervariante 1. Doch ergab sich bei dem knöchernen Anteil im Osteotomiespalt nur noch eine geringe Differenz zwischen den Klebervarianten, wobei das Wachstum der Klebervariante 1 immer noch leicht erhöht war. Bei allen Messwerten konnten keinerlei signifikante Unterschiede festgestellt werden.

Dass bei den Messwerten die Unterschiede nicht signifikant waren, ist erstaunlich, da bei der rein histologischen Betrachtung die Unterschiede zwischen den beiden Klebern deutlich erkennbar waren. Diese deutlichen histologischen Unterschiede werden auch durch die Dissertationsarbeit von Hahn (in Vorbereitung), die

signifikante Differenzen zwischen beiden Klebervarianten feststellt, bestätigt. Die Klebervariante 1 liefert dabei die wesentlich besseren Ergebnisse. Wohingegen sich die Klebervariante 2 teilweise sogar zelltoxisch verhält und eine starke Barriere für die Osteogenese bildet. Bei histologischer Betrachtung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Präparate kommt man ebenfalls zu diesem Ergebnis. Wo die Klebervariante 1 noch ähnliche histomorphometrische Ergebnisse wie die Kontrollgruppe liefert, und auch histologisch keine offensichtlichen Unterschiede erkennbar sind, sieht das bei der Klebervariante 2 anders aus. Es zeigt sich bei zwei der drei Präparate nach 21 Tagen fast keine Frakturheilung. Der Kleber bildet eine eindeutige Wachstumsbarriere. Nur bei einem Präparat ist ein deutliches Wachstum erkennbar. Über alle Präparate gemittelt, ergibt sich ein Mittelwert, der dann, verglichen mit der Klebervariante 1, keine signifikanten Unterschiede bestätigen kann. Das ist durch die geringe Präparatanzahl zu erklären. Dass sich keine signifikanten Unterschiede bei der geringen Anzahl von Präparaten herausstellten, kann kein Zeichen dafür sein, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Klebervarianten gibt. Bei einer geringen Anzahl von Beobachtungsobjekten besteht die große Gefahr von falsch negativen Ergebnissen, so dass man einen vorhandenen Unterschied nicht erkennt (Stapff, 2004). Bei mehr Präparaten sollte sich der Unterschied zwischen den Klebervarianten weit deutlicher herauskristallisieren.

Ganz ähnlich verhält es sich nach 42 Tagen. Hier zeigt eines der drei Präparate bei der histologischen Betrachtung nur minimales Knochenwachstum im Frakturspalt. Die beiden anderen Präparate sind histologisch kaum von den Präparaten, die mit der Klebervariante 1 behandelt wurden, zu unterscheiden. Über alle Präparate gemittelt ergeben sich wiederum keine signifikanten Differenzen. Auch hier müsste sich bei einer höheren Anzahl von Präparaten ein stärkerer Unterschied herausstellen.

Bei dem Vergleich der beiden Klebervarianten ist außerdem zu bedenken, dass sich die Fixationsmethoden der Femurkondyle unterscheiden. So sind bei der Klebervariante 1 zwei Kirschnerdrähte, bei der Klebervariante 2 jedoch ein Kirschnerdraht und eine Zugschraube verwendet worden. Mit der Zugschraube bei der Klebervariante 2 lässt sich eine größere Kompression auf den Osteotomiespalt ausüben. Durch diese erhöhten Druckkräfte wird die Frakturheilung gefördert (Meadows et al., 1990).

In diesem Zusammenhang ist auch wieder die Breite des Osteotomiespalt zu erwähnen. Er zeigt sich nach 21 Tagen bei der Klebervariante 1 durchschnittlich fast 1,5mal breiter, als bei der Klebervariante 2. Noch stärker ist der Unterschied nach 42 Tagen. Der Osteotomiespalt ist bei der Klebervariante 1 im Durchschnitt annähernd doppelt so breit. Diese Unterschiede relativieren die Messwerte, da die Osteotomieheilung für den breiteren Osteotomiespalt länger braucht und pro Flächeneinheit weniger Knochen zu finden ist als in einem schmalen Spalt (Claes et al., 1998). Es müsste so bei gleicher Spaltbreite und Operationstechnik die Überlegenheit der Klebervariante 1 deutlicher hervortreten.

Die Klebervariante 2 ist vor allen Dingen auf Grund der histologischen Betrachtung sicher nicht zu empfehlen, obwohl die histomorphometrischen Untersuchungen keinen signifikanten Unterschied zu der Klebervariante 1 feststellen konnten. Die Klebervariante 1 vermittelt dabei, sowohl bei den histologischen, als auch bei den histomorphometrischen Ergebnissen einen wesentlich besseren Eindruck. Die histomorphometrische Betrachtung müsste noch an einer größeren Präparatanzahl durchgeführt werden, um diesen Eindruck eindeutig zu bestätigen. Anhand der hierbei ermittelten histomorphometrischen Daten ist die Klebervariante 1 sicherlich zu empfehlen. Die Osteogenese zeigt dabei fast identische Wachstumstendenzen verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe.

## 5. Zusammenfassung

Ziel dieser tierexperimentellen Arbeit war der direkte Vergleich zweier Varianten eines neuentwickelten resorbierbaren und degradierbaren Knochenklebers in einem standardisierten Osteotomiemodell am Kaninchen. Durch knochenhistomorphometrische Analysen sollten die Unterschiede der Frakturheilung zwischen den beiden Knochenklebervarianten und zwischen verschiedenen Abschnitten innerhalb des Osteotomiespaltes herausgearbeitet werden.

Die beiden Knochenklebervarianten bestehen als Grundlage aus einer Ethylenglykol-oligolactid-dimethacrylat (ELAMA)-Verbindung, die als Comonomere in der Klebervariante 1 4% Methylmetacrylat (MMA) und in der Klebervariante 2 5% Hydroxyethylmethacrylat-oligolactid (HEMALA) enthalten. Sie polymerisieren zu hochverzweigten, hydrolysierbaren Netzwerken. Bei jedem Tier wurde eine monokondyläre laterale Femurosteotomie durchgeführt und die laterale Femurkondyle mit oder ohne Knochenkleber refixiert. Insgesamt wurden 22 Tiere untersucht und in 3 Gruppen (Kontrolle, Knochenklebervariante 1+2) eingeteilt. Die Gruppen wurden nach 21 und 42 Tagen nachbeobachtet. Die histomorphometrische Auswertung erfolgte mit dem computerunterstützten Bildanalysesystem KS 400® (Firma Carl Zeiss, Jena, Deutschland). Als histomorphometrische Parameter wurden TBV, S\*v, S/V, MTPT, MTPD, MTPS und Marrow Space Star Volume bestimmt.

Die Klebervariante 1 zeigte anhand der histomorphometrischen Auswertung keine Barriere für die physiologische Frakturheilung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei dem Vergleich der beiden Klebervarianten konnten keine signifikanten Unterschiede aufgezeigt werden, wobei sich bei den meisten Parametern nach 21 Tagen eine teils doppelt so starke Osteogenese der Klebervariante 1 feststellen ließ.

Der Vergleich verschiedener Abschnitte des Osteotomiespaltes zeigte eine signifikant bis hoch signifikant vermehrte Osteogenese im gelenknahen Bereich nach 42 Tagen. Ebenso war die Osteogenese nach 42 Tagen teilweise signifikant verstärkt in den ventralen Abschnitten der Femurkondyle. Nach 21 Tagen ließen sich dagegen keine signifikanten Unterschiede feststellen.

Die histomorphometrischen Ergebnisse zeigten zwar keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Klebervarianten, jedoch stellte sich bei dem Vergleich der Mittelwerte eine deutliche Überlegenheit der Klebervariante 1 mit MMA als



Comonomer, gegenüber der Klebervariante 2 mit HEMALA als Comonomer heraus. Diese Überlegenheit wurde durch histologische Beobachtungen untermauert. Weiterhin zeigte sich eine vermehrte Osteogenese in gelenknahen und in ventralen Abschnitten der Femurkondyle.

## 6. Summary

The aim of this experimental study was the direct comparison of two new resorbable and degradable types of bone adhesive in a standardized fracture model in rabbits. With bone histomorphometric analyses the differences in fracture healing between the two types of bone glue and between different parts of the fracture gap should be analyzed.

Both types of bone adhesive are based on Ethylenglycol-oligolactid-dimethacrylat (ELAMA) monomers. Type 1 contents 4% methylmetacrylat (MMA) as comonomers, type 2 5% hydroxyethyl-methacrylat-oligolactid (HEMALA). They polymerize into high branched, hydrolysable networks. A unifemoral osteotomy of the lateral femur was practiced on every animal. After that the lateral condyle of the femur was refixed with or without bone glue. Altogether 22 animals were examined and separated into three groups (control, bone glue type 1+2). The groups were observed on days 21 and 42. The histomorphometric analyses were made with the computer supported image analyzing system KS400<sup>®</sup> (Carl Zeiss, Jena, Germany). The histomorphometric parameters that were determined are TBV, S\*v, S/V, MTPT, MTPD, MTPS and Marrow Space Star Volume.

The bone adhesive type 1 showed by means of the histomorphometric evaluation no barrier for the physiological bone formation in comparison to the control group. The comparison of the two types of bone glue demonstrated no significant differences, although most of the parameters after 21 days showed almost twice as much bone formation of the bone adhesive type 1.

The comparison of different parts of the fracture gap presented significant as to high significant increased bone formation in the area close to the joint after 42 days. After 42 days also the ventral parts of the femoral condyle showed a partly significant increased bone formation. However there were no significant differences after 21 days.

Although there were no significant differences between the two types of bone glue, the differences of the average data showed the superiority of the bone adhesive type 1 with the comonomer MMA in comparison to the bone adhesive type 2 with HEMALA as comonomer. This superiority was confirmed by histological observation. Furthermore there was an increased bone formation in the area close to the joint and in ventral parts of the femoral condyle.

## 7. Literaturverzeichnis

Aaron JE, Johnson DR, Kanis JA, Oakley BA, O`Higgins P, Paxton SK (1992)

An automated method for the analysis of trabecular bone structure.

Comput Biomed Res 25 (1): 1-16

Al-Khawam EM, Brewis DM, Glasse MD (1983)

Cyanoacrylate adhesives of potential medical use.

In: Adhesion 7.

Allen KW, ed., Elsevier, London: 109-133

Aro HT, Wippermann BW, Hodgson SF, Chao EY (1990)

Internal remodeling of periosteal new bone during fracture healing.

J Orthop Res 8 (2): 238-246

Albrektsson T, Linder L (1981)

A method for short- and long-term in vivo study of the bone-implant interface.

Clin Orthop 159: 269-273

Alexandre C, Chappard D, Caulin F, Bertrand A, Palle S, Riffat G (1988)

Effects of a one-year administration of phosphate and intermittent calcitonin on bone-forming and bone-resorbing cells in involutional osteoporosis: a histomorphometric study.

Calcif Tissue Int 42 (6): 345-350

Alkan A, Erdem E, Gunhan O, Karasu C (2002)

Histomorphometric evaluation of the effect of doxycycline on the healing of bone defects in experimental diabetes mellitus: a pilot study.

J Oral Maxillofac Surg 60 (8): 898-904

Anderson JT, Eriksson JM, Thompson RC, Chao, EY (1978)

Pathologic femoral shaft fractures comparing fixation techniques using cement.

Clin Orthop 131: 273-278

Arbes H, Bosch P, Lintner F, Salzer M (1981)

First clinical experience with heterologous cancellous bone grafting combined with the fibrin adhesive system (F.A.S.).

Arch Orthop Trauma Surg 98 (3): 183-188

Bail HJ, Kolbeck S, Krummrey G, Schmidmaier G, Haas NP, Raschke MJ (2002)

Systemic application of growth hormone for enhancement of secondary and intramembranous fracture healing.

Horm Res 58 Suppl 3: 39-42

Berchtold R, Hamelmann H, Peiper H-J, Trentz O (1994)

In: Chirurgie, 3. Auflage.

Urban&Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore: 349-351

Bhat S, Askew MJ, Njus G, Smith DJ (1992)

Alkyl cyanoacrylates as space filling bone adhesives.

J Appl Biomater 3 (3): 207-210

Blom EJ, Klein-Nulend J, Yin L, van Waas MA, Burger EH (2001)

Transforming growth factor-beta1 incorporated in calcium phosphate cement stimulates osteotransductivity in rat calvarial bone defects.

Clin Oral Implants Res 12 (6): 609-616

Boehler N, Bosch P, Sandbach G, Eschberger J, Schmid L (1977)

Der Einfluss von homologem Fibrinogen auf die Osteotomieheilung beim Kaninchen.

Unfallheilkunde 80 (12): 501- 508

Bosch P (1981)

Die Fibrinspongiosaplastik. Experimentelle Untersuchungen und klinische Erfahrung.

Wien Klin Wochenschr 124: 1-26

Bosch P, Braun F, Eschberger J, Kovac W, Spangler HP (1977)

Die Beeinflussung der Knochenheilung durch hochkonzentriertes Fibrin.

Arch Orthop Unfall-Chir 89 (3): 259- 273

Bosch P, Hertz H, Lintner F, Nowotny R (1981)

Beschleunigt das Fibrinklebesystem (FKS) die Heilungsvorgänge von Sehngewebe?

Arch Orthop Trauma Surg 98 (4): 305-310

Brauer GM, Kumpula JW, Termini DJ, Davidson KM (1979)

Durability of the bond between bone and various 2-cyanoacrylates in an aqueous environment.

J Biomed Mater Res 13 (4): 593-606

Breusch SJ, Kuhn KD (2003)

Knochenzemente auf Basis von Polymethylmethacrylat

Orthopäde 32 (1): 41-50

Britto LR, Borer RE, Vertucci FJ, Haddix JE, Gordan VV (2002)

Comparison of the apical seal obtained by a dual-cure resin based cement or an epoxy resin sealer with or without the use of an acidic primer.

J Endod 28 (10): 721-723

Brückner H, Hinze M (1991)

In: Frakturen Luxationen Begleitverletzungen, 6. Auflage.

Verlag Gesundheit GmbH, Berlin: 70-72

Bullough PG, Bansal M, Di Carlo EF (1990)

The tissue diagnosis of metabolic bone disease. Role of histomorphometry.

Orthop Clin North Am 21 (1): 65-79

Bunker TD, Colton CL, Webb JK (1992)

In: Trends in der Frakturbehandlung, 1. Auflage.

Deutscher Ärzte-Verlag GmbH, Köln: 47-57

Cabanela ME, Coventry MB, Maccarty CS, Miller WE (1972)

The fate of patients with methyl methacrylate cranioplasty.

J Bone Joint Surg 54 (2): 278-281

Cameron JL, Woodward SC, Pulsaki EJ, Sleeman HK, Brandes G, Kulkarni RK, Leonard F (1965)

The degradation of cyanoacrylate tissue adhesive .  
Surgery 58: 424-430

Cameron HU, Jacob R, Macnab I, Pilliar RM (1975)

Use of polymethylmethacrylate to enhance screw fixation in bone.  
J Bone Joint Surg Am 57 (5): 655-656

Charnley J (1960)

The anchorage of the femoral head prosthesis to the shaft of the femur.  
J Bone Joint Surg Br 42: 28-30

Charnley J, Kettlewell J (1965)

The elimination of the slip between prosthesis and femur .  
J Bone Joint Surg 47: 56-60

Charnley J, Follacci FM, Hammond BT (1968)

The long term reaction of bone to self-curing acrylic cement.  
J Bone Joint Surg 50 (4): 822-829

Claes L, Hoellen L, Ignatius A (1997)

Resorbierbare Knochenzemente.  
Orthopäde 26 (5): 459-462

Claes LE, Heigele CA, Neidlinger-Wilke C, Kaspar D, Seidl W, Margevicius KJ, Augat P (1998)

Effects of mechanical factors on the fracture healing process.  
Clin Orthop (355 Suppl): 132-147

Compston J (1998)

Bone histomorphometry.

In: Methods in bone biology.

Arnett TR, Henderson B, eds., Chapman&Hall, London, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras: 177-194

Compston JE, Mellish RW, Garrahan NJ (1987)

Age-related changes in iliac crest trabecular microanatomic bone structure in man.

Bone 8 (5): 289-92

Compston JE, Garrahan NJ, Croucher PI, Wright CD, Yamaguchi K (1993)

Quantitative analysis of trabecular bone structure.

Bone 14 (3): 187-92

Comuzzi L, Ooms E, Jansen JA (2002)

Injectable calcium phosphate cements as a filler for bone defects around oral implants: an experimental study in goats.

Clin Oral Implants Res 13 (3): 304-311

Corn RC, Corn O, Matsumoto T (1972)

Osteosynthesis employing isobutyl-cyanoacrylate monomer.

Int Surg 57 (6): 483-487

Delling G (1975)

Endokrine Osteopathien: Morphologie, Histomorphometrie und Differentialdiagnose.

Veroff Pathol 98: 1-111

Dobing H, Turner RT (1997)

The effects of programmed administration of human parathyroid hormone fragment (1-34) on bone histomorphometry and serum chemistry in rats.

Endocrinology 138 (11): 4607-4612

Donath K, Breuner G (1982)

A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues.

The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique.

J Oral Pathol 11 (4): 318-26

Donkerwolcke M, Burny F, Muster D (1998)

Tissues and bone adhesives- historical aspects.

Biomaterials 19 (16): 1461-1466

Donohue WB, Mascres C (1993)

A comparison of the effects of two hydroxyapatites and a methacrylate resin on bone formation in the rat ilium.

Int J Oral Maxillofac Implants 8 (1): 75-82

Durnova GN, Loginov VI, Kaplanskii AS (2002)

Healing fibular bone fracture in rats during extended suspension.

Aviakosm Ekolog Med 36 (3): 52-55

Endler F (1980)

Einführung in die Biomechanik und Biotechnik des Bewegungsapparates.

In: Orthopädie in Praxis und Klinik (Band1), 2. Auflage.

Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York: 2.1-2.301

Eriksen EF, Steiniche T, Mosekilde L, Melsen F (1989)

Histomorphometric analysis of bone in metabolic bone disease.

Endocrinol Metab Clin North Am 18 (4): 919-954

Filmon R, Retailleau-Gaborit N, Grizon F, Galloyer M, Cincu C, Basle MF, Chappard D (2002)

Non-connected versus interconnected macroporosity in poly(2-hydroxyethyl methacrylate) polymers. An X-ray microtomographic and histomorphometric study.

J Biomater Sci Polym Ed 13 (10): 1105-1117



Fini M, Aldini NN, Cane V, Zaffe D, Giavaresi G, Rocca M, Guzzardella GA, Giardino R (1999)

Effects of essential amino acids and lactose on bony fractures and defects in rabbits: a preliminary histomorphometric study.

Arch Orthop Trauma Surg 119 (1-2): 39-45

Flautre B, Delecourt C, Blary MC, Van Landuyt P, Lemaitre J, Hardouin P (1999)

Volume effect on biological properties of a calcium phosphate hydraulic cement: experimental study in sheep.

Bone 25 (2 Suppl): 35-39

Frisch B, Bartl R (1999)

Necrosis, fractures, grafts and healing in bone.

In: Biopsy Interpretation of Bone and Bone Marrow, 2. Auflage.

Rothman R, ed., Arnold, London: 113-118

Frost HM (1966)

In: Bone dynamics in Osteoporosis and Osteomalacia.

Thomas, Springfield, Illinois

Frost HM (1983)

Bone histomorphometry: Analysis of trabecular bone dynamics.

In: Bone histomorphometry: Techniques and interpretation.

Recker RR, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida: 110-131

Gallempore RP, Green J, Shorr N, Goldberg RA (1999)

Use of isobutyl cyanoacrylate tissue adhesive to stabilize mucous membrane grafts in total socket reconstruction.

Ophthal Plast Reconstr Surg 15 (3): 210-212

Giebel G, Rimpler M (1981)

Klebungen am Skelettsystem: Klebstoffe, 50 Jahre Hilfsstoffe für den Chirurgen (Teil 1).

Biomed Techn 26 (3): 35-40

Gilmer WS, Tooms RE, Salvatore JE (1961)

An experimental study of the influence of implanted polyurethane sponges upon subsequent bone formation.

Suvs Med (Sofia) 113: 143-148

Guichelaar MM, Malinchoc M, Sibonga J, Clarke BL, Hay JE (2002)

Bone Metabolism in advanced cholestatic liver disease: analysis by bone histomorphometry.

Hepatology 36 (4 Pt 1): 895-903

Gundersen HJ, Bendsten TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard J, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby A et al. (1988)

Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis.

APMIS 96 (5): 379-394

Hahn N (in Vorbereitung)

Überprüfung der Biokompatibilität und der Degradation eines neuartigen bioresorbierbaren Knochenklebers - Ergebnisse einer tierexperimentellen Untersuchung an der Kaninchenfemurkondyle.

Dissertation in Vorbereitung, Gießen

Harrington KD, Johnston JO, Turner RH, Green DL (1972)

The use of methylmethacrylate as an adjunct in the internal fixation of malignant neoplastic fractures.

J Bone Joint Surg 54 (8): 1665-1676

Harrington KD, Sim FH, Enis JE, Johnston JO, Diok HM, Gristina AG (1976)

Methylmethacrylate as an adjunct in the internal fixation of pathological fractures. Experience with three hundred and seventy-five cases.

J Bone Joint Surg Am 58 (8): 1047-1055

Harris PJ, Tebby JC (1986)

Synthetic adhesives for surgery.

In: Adhesion 10.

Allen KW, ed., Elsevier, London: 1-6

Heiss C, Schnettler R (2003)

Bioresorbable adhesives in trauma and orthopaedic surgery.

Biomaterialien 4 (4): 298-304

Heiss C, Hahn N, Pokinskyj P, Wensch S, Stahl JP, Meyer C, Schnettler R (2004)

Properties and degradation of a new bioresorbable bone glue.

Biomed Tech 49 (6): 163-169

Hench LL, Wilson J (1984)

Surface-active biomaterials.

Science 226 (4675): 630-636

Henning A (1956)

Bestimmung der Oberfläche beliebig geformter Körper mit besonderer Anwendung auf Körperhaufen im mikroskopischen Bereich.

Mikroskopie 11 (1-2): 1-20

Hirata T, Ogawa E, Takenaka K, Umokawa R, Fujisawa I (2002)

Endobronchial closure of postoperative bronchopleural fistula using vascular occluding coils and n-butyl-2-cyanoacrylate.

Ann Thorac Surg 74 (6): 2174-2176

Holmstrom T, Paavolainen P, Slati P, Karaharju E (1986)

Effect of compression on fracture healing. Plate fixation studied in rabbits.

Acta Orthop Scand 57 (4): 368-372

Hubaille C, De Groot V, Tassignon MJ (2001)

Comparison of preoperative target ametropia and postoperative refraction for three types of lenses and intra-ocular differences (one pliable acrylic, one pliable PMMA-copolymer and one non-pliable PMMA).

Bull Soc Belge Ophtalmol (280): 35-42

Hunter KM (1976)

Cyanoacrylate tissue adhesives in osseous repair.

Br J Oral Surg 14 (1): 80-86

Ikenaga M, Hardouin P, Lemaitre J, Andrianjatovo H, Flautre B (1998)

Biomechanical characterization of a biodegradable calcium phosphate hydraulic cement: a comparison with porous biphasic calcium phosphate ceramics.

J Biomed Mater Res 40 (1): 139-144

Isogai N, Landis WJ, Mori R, Gotoh Y, Gerstenfeld LC, Upton J, Vacanti JP (2000)

Experimental use of fibrin glue to induce site-directed osteogenesis from cultured periosteal cells.

Plast Reconstr Surg 105 (3): 953-963

Jasty MJ, Floyd WE, Schiller AL, Goldring SR, Harris WH (1986)

Localized osteolysis in stable, non-septic total hip replacement.

J Bone Joint Surg Am 68 (6): 912-919

Johner R (1972)

Zur Knochenheilung in Abhängigkeit von der Defektgröße.

Helv Chir Acta 39 (1): 409-411

Junqueira LC, Carneiro J (1996)

In: Histologie, 4. Auflage.

Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York: 196-200

Kamen PR (1989)

Attachment of human oral fibroblasts to a granular polymeric implant for hard tissue replacement.

J Oral Implantol 15 (1): 52-56

Kaufman RS (1974)

The use of tissue adhesives (isobutyl-cyanoacrylate) and topical steroid (0,1 percent dexamethasone) in experimental tympanoplasty.

Laryngoscope 84 (5): 793-804

Kawahara H (1985)

Biological requirements for biomaterials.

Implantologist 3 (2): 41-49

Kennedy WR (1978)

Fracture of the tibial condyles: a preliminary report on supplementary fixation with methylmethacrylate.

Clin Orthop 134: 153-157

Kerr AG, Smyth GDL (1971)

Bucrylate (isobutyl cyanoacrylate) as an ossicular adhesive.

Arch Otolaryngol 94 (2): 129-131

Kimmel DB, Recker RR, Gallagher JC, Vaswani AS, Aloia JF (1990)

A comparison of iliac bone histomorphometric data in post-menopausal osteoporotic and normal subjects.

Bone Miner 11 (2): 217-235

Lee AJC (1988)

Series foreward.

In: Advances in Biomaterials 8.

de Putter C, de Lange GL, de Groot K, Lee AJC, eds., Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam

Lennox DW, Schofield BH, McDonald DF, Riley LH (1987)

A histologic comparison of aseptic loosening of cemented, press-fit, and biologic ingrowth prostheses.

Clin Orthop 225: 171-191

Lenz C (2003)

Fracture healing.

Online in Internet: <http://grk615.uni-hannover.de/sites/gradkolleg/stipendiaten/lenz/fracture.html> (Stand 01.12.2004).

Lew D, Farrell B, Bardach J, Keller J (1997)

Repair of craniofacial defects with hydroxyapatite cement.

J Oral Maxillofac Surg 55 (12): 1441-1449

Lewandrowski KU, Cattaneo MV, Gresser JD, Wise DL, White RL, Bonassar L, Trantolo DJ (1999 A)

Effect of a poly(propylene fumarate) foaming cement on the healing of bone defects.

Tissue Eng 5 (4): 305-316

Lewandrowski KU, Bondre S, Gresser JD, Silva AE, Wise DL, Trantolo DJ (1999 B)

Augmentation of osteoinduction with a biodegradable poly(propylene glycol-co-fumaric acid) bone graft extender. A histologic and histomorphometric study in rats.

Biomed Mater Eng 9 (5-6): 325-334

Lewandrowski KU, Gresser JD, Wise DL, White RL, Trantolo DJ (2000)

Osteoconductivity of an injectable and bioresorbable poly(propylene glycol-co-fumaric acid) bone cement.

Biomaterials 21 (3): 293-298

Lewandrowski KU, Bondre SP, Wise DL, Trantolo DJ (2002)

Healing of osteochondral osteotomies after fixation with a hydroxyapatite-buffered polylactide. A histomorphometric and radiographic study in rabbits.

Biomed Mater Eng 12 (3): 259-270

Linden CL, Shalaby SW (1997)

Performance of modified cyanoacrylate composition as tissue adhesives for soft and hard tissues.

J Biomed Mater Res 38 (4): 348-355

Linder L (1977)

Reaction of bone to the acute chemical trauma of bone cement.

J Bone Joint Surg Am 59 (1): 82-87

Lubicky JP, DeWald RL (1982)

Methylmethacrylate reconstruction of large iliac crest bone graft donor sites.

Clin Orthop 164: 252-256

Lykins CL, Friedman CD, Costantino PD, Horioglu R (1998)

Hydroxyapatite cement in craniofacial skeletal reconstruction and its effects on the developing craniofacial skeleton.

Arch Otolaryngol Head Neck Surg 124 (2): 153-159

Maldonado TS, Rosen RJ, Rockman CB, Adelman MA, Bajakian D, Jacobowitz GR, Riles TS, Lamparello PJ (2003)

Initial successful management of type I endoleak after endovascular aortic aneurysm repair with n-butyl cyanoacrylate adhesive.

J Vasc Surg 38 (4): 664-670

Mannocci F, Ferrari M (1998)

Apical seal of roots obturated with laterally condensed gutta-percha, epoxy resin cement, and dentin bonding agent.

J Endod 24 (1): 41-44

Matsumoto T (1970)

Review of cyanoacrylate monomers in surgery.

In: Manly RS, editor. Adhesion in biological system. New York: Academic Press: 209-214

Meadows TH, Bronk JT, Chao YS, Kelly PJ (1990)

Effect of weight-bearing on healing of cortical defects in the canine tibia.

J Bone Joint Surg Am 72 (7): 1074-1080

Merz WA (1967)

Die Streckenmessung an gerichteten Strukturen im Mikroskop und ihre Anwendung zur Bestimmung von Oberflächen-Volumen-Relationen im Knochengewebe.

Mikroskopie 22 (5): 132-142

Meyer G, Muster D, Schmitt D, Jung P, Jaeger JH (1979)

One bonding through bioadhesives: present status.

Biomater Med Devices Artif Organs 7 (1): 55-71

Müller ME (1962)

Die Verwendung von Kunstharzen in der Knochenchirurgie.

Arch orthop Unfall-Chir 54: 513-522

Nakamura K, Koshino T, Saito T (1998)

Osteogenic response of the rabbit femur to a hydroxyapatite thermal decomposition product-fibrin glue mixture.

Biomaterials 19 (20): 1901-1907

Niethard FU, Pfeil J (1997)

In: Orthopädie, 3. Auflage.

Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart: 311-313

Obwegeser JA (1998)

Resorbier- und umbaubare Osteosynthesematerialien in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie.

Mund Kiefer Gesichtschir 2 (6): 288- 308

Osborn JF (1985)

In: Implantatwerkstoff Hydroxylapatit – Grundlagen und klinische Anwendung.

Quintessenz-Verlag, Berlin: 127-140



Ostermann PA, Neumann K, Ekkernkamp A, Muhr G (1994)

Long term results of unicondylar fractures of the femur.

J Orthop Trauma 8 (2): 142-146

Parfitt AM (1983)

The physiologic and clinical significance of bone histomorphometric data.

In: Bone histomorphometry: Techniques and interpretation.

Recker RR, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida: 142-223

Parfitt AM (1988)

Bone histomorphometry: Proposed system for standardization of nomenclature, symbols and units.

Calcif Tissue Int 42 (5): 284-286

Parfitt AM, Mathews CH, Villanueva AR, Kleerekoper M, Frame B, Rao DS (1983)

Relationships between surface, volume and thickness of iliac trabecular bone in aging and in osteoporosis. Implications for the microanatomic and cellular mechanisms of bone loss.

J Clin Invest 72 (4): 1396-1409

Park W, Kim WH, Lee CH, Kim DY, Choi JH, Huh JW, Sung HM, Kim IS, Kweon OK (2002)

Comparison of two fibrin glues in anastomoses and skin closure.

J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med 49 (7): 385-389

Pataki A, Muller K, Green JR, Ma YF, Li QN, Jee WS (1997)

Effects of short-term treatment with the bisphosphonates zoledronate and pamidronate on rat bone: a comparative histomorphometric study on the cancellous bone formed before, during, and after treatment.

Anat Rec 249 (4): 458-468

Pelayo Salas, Perez Ruiz L, Marco Estarreado L, Guidolin D, Del Carmen Garces Guallart M (2002)

Venous microanastomoses by fibrin glue versus standard technique.

Minerva Chir 57 (4): 489-494

Perry MJ, Youngson CC (1995)

In vitro fracture fixation: adhesives systems compared with a conventional technique .

Br J Oral Maxillofac Surg 33 (4): 224-227

Raschke M, Wildemann B, Inden P, Bail H, Flyvbjerg A, Hoffmann J, Haas NP, Schmidmaier G (2002)

Insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1 accelerates osteotomy healing using polylactide-coated implants as a delivery system: a biomechanical and histological study in minipigs.

Bone 30 (1): 144-151

Rauber A, Kopsch F (2003)

In: Anatomie des Menschen- Band I- Bewegungsapparat, 3. Auflage.

Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York: 39

Recker RR (1994)

Bone biopsy and histomorphometry in clinical practice.

Rheum Dis Clin North Am 20 (3): 609-627

Redler I (1960)

Chemical Osteosynthesis.

Am J Surg 99: 730-732

Reiche D (2003)

In: Roche Lexikon Medizin, 5. Auflage.

Urban&Fischer, München, Jena: 643

Ritzel H, Amling M, Vogel M, Pösl M, Hahn M, Werner M, Dellling G (1996)

Spongiosastruktur und polyostotische Heterogenität bei Osteoporose.

Pathologe 17 (1): 68-77

Rose PL, Hightower D, Auer JA, Hulse D, Schenk RK (1987)

Radionuclide, radiographic, and histomorphometric evaluation of healing of surgically created subchondral defects in equine bone.

Am J Physiol Imaging 2 (3): 105-109

Rozhnova RA, Bondarchuk VI, Savitskaia ES, Levenets EG, Popov VA, Galatenko NA (2002)

Replacement of bone defects with a polyurethane composition with hydroxyapatite high-filling.

Lik Sprava (1): 107-110

Rutskii VV, Kholopov OV, Smirnov AS (1975)

Certain theoretical and practical problems of adhesive ultrasonic osteosynthesis.

Ortop Travmatol Protez 10: 18-24

Schatzker J, Ha'eri GB, Chapman M (1978)

Methylmethacrylate as an adjunct in the internal fixation of intertrochanteric fractures of the femur.

J Trauma 18 (10): 732-735

Schenk RK (1978)

Die Histologie der primären Knochenheilung im Lichte neuer Konzeptionen über den Knochenumbau.

Unfallheilkunde 81 (4): 219-227

Schenk RK, Willenegger HR (1964)

Zur Histologie der primären Knochenheilung.

Langenbecks Arch Chir 308: 440-451

Schenk RK, Willenegger HR (1977)

Zur Histologie der primären Knochenheilung: Modifikationen und Grenzen der Spaltheilung in Abhängigkeit von der Defektgröße.

Unfallheilkunde 80 (5): 155-160

Schenk RK, Hunziker EB (1994)

Histologic and Ultrastructural Features of Fracture Healing.

In: Bone Formation and Repair.

Brighton CT, Friedlaender G, Lane JM, eds., Academy of Orthopaedic Surgeons, Rosemont, Illinois: 117-146

Schiebler TH, Schmidt W, Zilles K (1999)

In: Anatomie, 8. Auflage.

Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 65-66

Schlag G, Redl H (1988)

Fibrin sealant in orthopedic surgery.

Clin Orthop Rel Res 227: 269-285

Schmidmaier G, Wildemann B, Bail H, Lucke M, Stemberger A, Flyvbjerg A, Raschke M (2000)

Local liberation of IGF-I and TGF-beta 1 from a biodegradable poly(D,L-lactide) coating of implants accelerates fracture healing.

Chirurg 71 (9): 1016-1022

Schmidmaier G, Wildemann B, Bail H, Lucke M, Fuchs T, Stemberger A, Flyvbjerg A, Haas NP, Raschke M (2001)

Local application of growth factors (insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1) from a biodegradable poly(D,L-lactide) coating of osteosynthetic implants accelerates fracture healing in rats.

Bone 28 (4): 341-350

Schwartz MP, Recker RR (1981)

Comparison of surface density and volume of human iliac trabecular bone measured directly and by applied stereology.

Calcif Tissue Int 33 (6): 561-565

Shapiro MS (1973)

Healing of fractures after bone glue osteosynthesis.

Khirurgiia (Mosk.) 49 (12): 50-55

Shermak MA, Wong L, Inoue N, Crain BJ, Im MJ, Chao EY, Manson PN (1998)

Fixation of the craniofacial skeleton with butyl-2-cyanoacrylate and its effects on histotoxicity and healing.

Plast Reconstr surg 102 (2): 309-318

Sherman RMP, Byrick RJ, Kay JC, Sullivan R, Waddell JP (1983)

The role of lavage in preventing hemodynamic and blood-gas changes during cemented arthroplasty.

J Bone Joint Surg Am 65 (4): 500-506

Silver IA (1976)

Tissue adhesives.

Vet Rec 98 (20): 405-406

Smith DC (1971)

Medical and dental applications of cements.

J Biomed Mater Res 5 (2): 189-205

Smith DC (1973)

Lutes, glues, cements and adhesives in medicine and dentistry.

Biomed Eng 8 (3): 108-115

Sorensen WG, Bloom JD, Kelly PJ (1979)

The effects of intramedullary methylmethacrylate and reaming on the circulation of the tibia after osteotomy and plate fixation in dogs.

J Bone Joint Surg 61 (3): 417-424

Spaans CJ, Belgraver VW, Rienstra O, de Groot JH, Veth RP, Pennings AJ (2000)

Solvent-free fabrication of micro-porous polyurethane amide and polyurethane-urea scaffolds for repair and replacement of the knee-joint meniscus.

Biomaterials 21 (23): 2453-2460

Sperling P, Hartmann J (2001)

Aktueller Stand der Fibrinklebung in der Therapie der Milzverletzung [Record Supplied By Aries Systems].

Chirurgische Gastroenterologie 17: 28-32

Stapff M (2004)

Fallgrube Statistik Teil 2.

DZKF 7/8: 44-51

Stephan E, Buntrock P, Kohler S (1989)

Comparative animal experiments of different tissue adhesives. I. Tensile strength studies. II. Histologic and morphometric studies.

Z Exp Chir Transplant Künstliche Organe 22 (4): 221-234

Tabb HG (1968)

Ossicular repositioning with "bone glue" in tympanoplasty.

Trans Pac Coast Otophthalmol Soc Annu Meet 52: 51-55

Tiling T, Meffert O, Stankovic P (1979)

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über Osteosynthesen und Knochendefektauffüllungen mit Cyanoacrylat

Chir Forum Exp Klin Forsch: 203-206

Uhthoff HK, Goto S, Cerckel PH (1987)

Influence of stable fixation on trabecular bone healing: a morphologic assessment in dogs.

J Orthop Res 5 (1): 14-22

Vasenius J, Vainionpaa S, Vihtonen K, Mero M, Makela A, Tormala P, Rokkanen P (1990)

A histomorphological study on self-reinforced polyglycolide (SR-PGA) osteosynthesis implants coated with slowly absorbable polymers.

J Biomed Mater Res 24 (12): 1615-1635

Vesterby A, Gundersen HJ, Melsen F (1989)

Star volume of marrow space and trabeculae of the first lumbar vertebra: sampling efficiency and biological variation.

Bone 10 (1): 7-13

Welch RD, Birch JG, Makarov MR, Samchukov ML (1998)

Histomorphometry of distraction osteogenesis in a caprine tibial lengthening model.

J Bone Miner Res 13 (1): 1-9

Welch RD, Berry BH, Crawford K, Zhang H, Zobitz M, Bronson D, Krishnan S (2002)

Subchondral defects in caprine femora augmented with in situ setting hydroxyapatite cement, polymethylmethacrylate, or autogenous bone graft: biomechanical and histomorphological analysis after two-years.

J Orthop Res 20 (3): 464-472

Wenz R (1998)

First Results with a Bioresorbable Bone Glue.

In: Biomaterials in Surgery.

Walenkamp GHM, ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York: 132-135

- West PG, Rowland GR, Budsberg SC, Aron DN (1996)  
Histomorphometric and angiographic analysis of bone healing in the humerus of pigeons.  
Am J Vet Res 57 (7): 1010-1015
- Willenegger H, Perren SM, Schenk R (1971)  
Primäre und sekundäre Knochenbruchheilung.  
Chirurg 42 (6): 241- 252
- Williams DF (1988)  
Consensus and definitions in biomaterials .  
In: Advances in Biomaterials 8 .  
de Putter C, de Lange GL, de Groot K, Lee AJC, eds., Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam: 11-16
- Wimhurst JA, Brooks RA, Rushton N (2001)  
The effects of particulate bone cements at the bone-implant interface.  
J Bone Joint Surg Br 83 (4): 588-592
- Winking M, Stahl JP, Oertel M, Schnettler R, Boker DK (2003)  
Polymethylmethacrylat-Vertebroplastie – Eine neue und effektive Schmerztherapie bei Wirbelkompressionen.  
Dtsch Med Wochenschr 128 (48): 2525-2530
- Wissing H, Stürmer KM, Breidenstein G (1990)  
Die Wertigkeit verschiedener Versuchstierspecies für experimentelle Untersuchungen am Knochen.  
Hft Unfallheilkunde 212: 479-488
- Yamada Y, Boo JS, Ozawa R, Nagasaka T, Okazaki Y, Hata K, Ueda M (2003)  
Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold.  
J Craniomaxillofac Surg 31 (1): 27-33



Yasuoka T, Oka N (1991)

Histomorphometric study of trabecular bone remodelling during condylar process fracture healing in the growing period: experimental study.

J Oral Maxillofac Surg 49 (9): 981-988

Zheng Q, Wang H (1996)

A histomorphometric study on the bone healing after oblique osteotomy of the mandibular ramus.

Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi 31 (3): 172-175

## 8. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Dreidimensionale Darstellung des Lamellenknochenaufbaus (Rauber und Kopsch, 2003).	3
Abb. 2: Darstellung eines Osteons im Lamellenknochen (Lenz, 2003).	4
Abb. 3: Primärheilung bei stabiler Osteosynthese: Kontaktheilung und Spaltheilung (Reiche, 2003).	5
Abb. 4: Verschiedene Stadien der Sekundärheilung (Lenz, 2003).	7
Tab. 1: Versuchsprotokoll – Gruppeneinteilung.	23
Abb. 5a: Markierung der Osteotomie-richtung durch K-Draht.	24
Abb. 5b: Osteotomie mit oszillierender Säge (Separation der lateralen Femurkondyle).	24
Abb. 6a: Kleberapplikation in den Osteotomiespalt.	25
Abb. 6b: Anatomische Reposition der lateralen Femurkondyle mit einer spitzen Repositionsklemme (Fixationsphase).	25
Abb. 7: Fixation der lateralen Femurkondyle durch zwei 1 mm starke, parallel eingebrachte Kirschner-Drähte aus Titan (senkrecht zur anatomischen Achse) (Serie 1).	25
Abb. 8: Einbringen einer 3,5 mm kanülierten Titan-Schraube (Zugschraube) mit kurzem Gewinde über Führungsdraht (Serie 2).	26
Abb. 9: Einteilung der Schnittebenen - 9 Längsschnitte, 2 Querschnitte.	30
Abb. 10: Auspolymerisierte TECHNOVIT Knochenblöcke.	30
Abb. 11: Trennsystem mit eingespanntem Knochenblock.	32
Abb. 12: Zweistufige Synthese von Ethylenglycol-oligolactid-dimethacrylat (ELAMA), ausgehend von Ethylglykol (A), Lactid/Milchsäure (B) und Methacrylsäure (C).	35
Abb. 13: Die Comonomere der Knochenklebervariante 1: MMA und der Knochenklebervariante 2: HEMALA-1,3.	35
Abb. 14: Polymeres Netzwerk des Knochenklebers.	36
Tab. 2: Anzahl der ausgewerteten Tiere pro Versuchsgruppe.	38

Abb. 15: 7-Tage Präparat der Klebergruppe ohne knöchernes Wachstum im Frakturspalt.	38
Abb. 16: 84-Tage Präparat der Klebervariante 1 mit kompletter Durchbauung des Frakturspaltes.	39
Abb. 17: 21-Tage Präparat der Kontrollgruppe mit zu schmalem Frakturspalt für die Auswertung.	39
Abb. 9: Einteilung der Schnittebenen - 9 Längsschnitte, 2 Querschnitte.	40
Abb. 18: Computerunterstütztes Bildanalysesystem KS400® (Firma Carl Zeiss, Jena, Deutschland).	41
Abb. 19: Aus Einzelbildern zusammengesetztes 42-Tage Präparat aus der Kontrollgruppe.	42
Abb. 20: Nach van Gieson gefärbtes Originalpräparat eines 42-Tage Präparates der Kontrollgruppe zur licht-mikroskopischen Kontrolle der Nachbearbeitung und der korrekten Einlage der Messfeldquadranten.	43
Abb. 21: Einteilung der Messfeldquadranten bei einem 42-Tage Präparat der Kontrollgruppe.	44
Abb. 22: Einteilung der Messfeldquadranten bei Anwesenheit eines Kirschner-Drahtes in einem 21-Tage Präparat der Kontrollgruppe.	45
Abb. 23: TBV der 21- und 42-Tage Kontroll- und Klebergruppe.	47
Abb. 24: S*v der 21- und 42-Tage Kontroll- und Klebergruppe.	48
Abb. 25: S/V der 21- und 42-Tage Kontroll- und Klebergruppe.	49
Abb. 26: MTPT der 21- und 42-Tage Kontroll- und Klebergruppe.	50
Abb. 27: MTPD der 21- und 42-Tage Kontroll- und Klebergruppe.	50
Abb. 28: MTPS der 21- und 42-Tage Kontroll- und Klebergruppe.	51
Abb. 29: Marrow Space Star Volume der 21- und 42-Tage Kontroll- und Klebergruppe.	52
Abb. 30: TBV der Klebervariante 1 und der Kontrollgruppe nach 21 und 42 Tagen.	53
Abb. 31: S*v der Klebervariante 1 und der Kontrollgruppe nach 21 und 42 Tagen.	54

Abb. 32: S/V der Klebervariante 1 und der Kontrollgruppe nach 21 und 42 Tagen.	54
Abb. 33: MTPT der Klebervariante 1 und der Kontrollgruppe nach 21 und 42 Tagen.	55
Abb. 34: MTPD der Klebervariante 1 und der Kontrollgruppe nach 21 und 42 Tagen.	55
Abb. 35: MTPS der Klebervariante 1 und der Kontrollgruppe nach 21 und 42 Tagen.	56
Abb. 36: Marrow Space Star Volume der Klebervariante 1 und der Kontrollgruppe nach 21 und 42 Tagen.	57
Abb. 37: TBV der drei Messfelder innerhalb des Osteotomiespaltes nach 21 und 42 Tagen.	58
Abb. 38: S*v der drei Felder innerhalb des Osteotomiespaltes nach 21 und 42 Tagen.	59
Abb. 39: S/V der drei Felder innerhalb des Osteotomiespaltes nach 21 und 42 Tagen.	59
Abb. 40: MTPT der drei Felder innerhalb des Osteotomiespaltes nach 21 und 42 Tagen.	60
Abb. 41: MTPD der drei Felder innerhalb des Osteotomiespaltes nach 21 und 42 Tagen.	61
Abb. 42: MTPS der drei Felder innerhalb des Osteotomiespaltes nach 21 und 42 Tagen.	61
Abb. 43: Marrow Space Star Volume der drei Felder innerhalb des Osteotomiespaltes nach 21 und 42 Tagen.	62
Abb. 44: TBV der Schnittebenen nach 21 und 42 Tagen.	63
Abb. 45: S*v der Schnittebenen nach 21 und 42 Tagen.	64
Abb. 46: S/V der Schnittebenen nach 21 und 42 Tagen.	65
Abb. 47: MTPT der Schnittebenen nach 21 und 42 Tagen.	65
Abb. 48: MTPD der Schnittebenen nach 21 und 42 Tagen.	66
Abb. 49: MTPS der Schnittebenen nach 21 und 42 Tagen.	66
Abb. 50: Marrow Space Star Volume der Schnittebenen nach 21 und 42 Tagen.	67

Abb. 51: TBV der Klebervarianten nach 21 und 42 Tagen.	68
Abb. 52: S*v der Klebervarianten nach 21 und 42 Tagen.	69
Abb. 53: S/V der Klebervarianten nach 21 und 42 Tagen.	69
Abb. 54: MTPT der Klebervarianten nach 21 und 42 Tagen.	70
Abb. 55: MTPD der Klebervarianten nach 21 und 42 Tagen.	71
Abb. 56: MTPS der Klebervarianten nach 21 und 42 Tagen.	71
Abb. 57: Marrow Space Star Volume der Klebervarianten nach 21 und 42 Tagen.	72
Abb. 20: Nach van Gieson gefärbtes Originalpräparat eines 42-Tage Präparates der Kontrollgruppe zur licht-mikroskopischen Kontrolle der Nachbearbeitung und der korrekten Einlage der Messfeldquadranten.	77
Abb. 21: Einteilung der Messfeldquadranten bei einem 42-Tage Präparat der Kontrollgruppe.	78
Abb. 15: 7-Tage Präparat der Klebergruppe ohne knöchernes Wachstum im Frakturspalt.	79
Abb. 16: 84-Tage Präparat der Klebervariante 1 mit kompletter Durchbauung des Frakturspaltes.	80
Abb. 17: 21-Tage Präparat der Kontrollgruppe mit zu schmalem Frakturspalt für die Auswertung.	80
Abb. 58: 42-Tage Präparat der Klebervariante 2 ohne knöcherne Elemente im Frakturspalt.	81
Abb. 9: Einteilung der Schnittebenen - 9 Längsschnitte, 2 Querschnitte.	87

## 9. Tabellenanhang

Tab.1: Vergleich der beiden Tötungstage in der 1. Klebergruppe

Parameter	TBV	S*V	S/V	MTPT	MTPD	MTPS	Ma-Sp-Star
TötTag21(n=4)	36,68+- 5,07	4,34+-0,49	12,86+- 1,14	166,31+- 12,55	2,17+-0,24	442,00+- 1043,98	0,12+-0,03
TötTag42(n=6)	26,44+- 4,14	1,97+-0,40	8,94+-0,93	247,89+- 10,25	0,99+-1,20	2274,11+- 852,41	0,34+-0,03

Tab.2: Vergleich der beiden Tötungstage in der Kontrollgruppe

Parameter	TBV	S*V	S/V	MTPT	MTPD	MTPS	Ma-Sp-Star
TötTag21(n=3)	34,56+- 5,85	4,62+-0,56	14,86+- 1,31	144,21+- 14,49	2,31+-0,28	373,57+- 1205,48	0,09+-0,04
TötTag42(n=3)	34,10+- 5,85	2,61+-0,56	8,14+-1,31	253,88+- 14,49	1,30+-0,28	727,55+- 1205,48	0,34+-0,04

Tab.3: Vergleich der Kleber- und der Kontrollgruppe am 21. Tötungstag

Parameter	TBV	S*V	S/V	MTPT	MTPD	MTPS	Ma-Sp-Star
Kleber(n=4)	36,68+- 6,14	4,34+-0,64	12,86+- 1,38	166,31+- 10,78	2,17+-0,32	442,00+-143,31	0,12+-0,02
Kontrolle(n=3)	34,56+- 7,09	4,62+-0,74	14,86+- 1,60	144,21+- 12,45	2,31+-0,37	373,57+-165,48	0,09+-0,02

Tab.4: Vergleich der Kleber- und der Kontrollgruppe am 42. Tötungstag

Parameter	TBV	S*V	S/V	MTPT	MTPD	MTPS	Ma-Sp-Star
Kleber(n=6)	26,44+- 3,38	1,97+-0,28	8,94+-0,75	247,89+- 11,16	0,99+-0,14	2274,11+- 1111,67	0,34+-0,03
Kontrolle(n=3)	34,10+- 4,78	2,61+-0,40	8,14+-1,07	253,88+- 15,78	1,30+-0,20	727,55+- 1572,14	0,34+-0,05

Tab.5: Vergleich der beiden Längsschnitte am 21. Tötungstag

Parameter	TBV	S*V	S/V	MTPT	MTPD	MTPS	Ma-Sp-Star
Schnitt1(n=7)	37,42+- 4,33	4,75+-0,41	14,01+- 0,63	151,22+-7,74	2,38+-0,20	356,48+-227,26	0,09+-0,03
Schnitt2(n=7)	33,82+- 3,81	4,21+-0,38	13,72+- 1,20	159,30+- 12,89	2,11+-0,19	459,09+- 1426,05	0,12+-0,04

Tab.6: Vergleich der beiden Längsschnitte am 42. Tötungstag

Parameter	TBV	S*V	S/V	MTPT	MTPD	MTPS	Ma-Sp-Star
Schnitt1(n=9)	26,31+- 4,01	2,08+-0,38	8,82+-0,58	238,81+-7,17	1,04+-0,19	1116,12+-210,41	0,30+-0,02
Schnitt2(n=9)	34,23+- 3,53	2,50+-0,35	8,26+-1,11	262,96+- 11,94	1,25+-0,17	1885,55+- 1320,27	0,38+-0,03

Tab.7: Vergleich der drei Felder am 21. Tötungstag

Parameter	TBV	S*V	S/V	MTPT	MTPD	MTPS	Ma-Sp-Star
Feld1(n=7)	33,42+- 4,54	4,27+-0,49	14,56+- 0,71	149,86+- 11,82	2,13+-0,24	449,34+-111,49	0,10+-0,05
Feld2(n=7)	37,07+- 5,20	4,79+-0,45	13,74+- 1,09	151,58+- 14,42	2,40+-0,22	303,13+-458,62	0,08+-0,03
Feld3(n=7)	36,37+- 4,48	4,39+-0,41	13,29+- 1,67	164,33+- 20,27	2,19+-0,21	470,89+- 1985,77	0,13+-0,06

Tab.8: Vergleich der drei Felder am 42. Tötungstag

Parameter	TBV	S*V	S/V	MTPT	MTPD	MTPS	Ma-Sp-Star
Feld1(n=9)	45,83+- 4,20	3,22+-0,45	7,07+-0,66	287,77+- 10,94	1,61+-0,23	400,97+-103,22	0,48+-0,05
Feld2(n=9)	23,62+- 4,81	1,93+-0,41	9,36+-1,01	227,57+- 13,35	0,96+-0,21	1355,56+-424,60	0,25+-0,03
Feld3(n=9)	21,36+- 4,15	1,72+-0,38	9,19+-1,54	237,31+- 18,77	0,86+-0,19	2745,97+- 1838,46	0,30+-0,05

Tab.9: Vergleich der beiden Kleber am 21. Tötungstag

Parameter	TBV	S*V	S/V	MTPT	MTPD	MTPS	Ma-Sp-Star
Kleber1(n=4)	36,68+- 7,48	4,34+-0,64	12,86+- 2,93	166,31+- 20,57	2,17+-0,32	442,00+-1470,94	0,12+-0,05
Kleber2(n=3)	21,76+- 8,64	3,03+-0,74	24,43+- 3,39	119,30+- 23,77	1,51+-0,37	1870,62+- 1698,50	0,08+-0,06

Tab.10: Vergleich der beiden Kleber am 42. Tötungstag

Parameter	TBV	S*V	S/V	MTPT	MTPD	MTPS	Ma-Sp-Star
Kleber1(n=6)	26,44+- 6,11	1,97+-0,52	8,94+-2,39	247,89+- 16,81	0,99+-0,26	2274,11+- 1201,02	0,34+-0,04
Kleber2(n=3)	24,22+- 8,64	2,11+-0,74	15,33+- 3,39	190,82+- 23,77	1,05+-0,37	3336,90+- 1698,50	0,29+-0,06

Tab.11: Vergleich der beiden Tötungstage in der 2. Klebergruppe

Parameter	TBV	S*V	S/V	MTPT	MTPD	MTPS	Ma-Sp-Star
TötTag21(n=3)	21,76+- 8,64	3,03+-0,74	24,43+- 3,39	119,30+- 23,77	1,51+-0,37	1870,62+- 1698,50	0,08+-0,06
TötTag42(n=3)	24,22+- 8,64	2,11+-0,74	15,33+- 3,39	190,82+- 23,77	1,05+-0,37	3336,90+- 1698,50	0,29+-0,06



---

## Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich in irgendeiner Form bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben und so diese Arbeit überhaupt erst möglich machten.

Zu allererst möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. Schnettler danken für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Heiß bin ich zu großem Dank verpflichtet für die Betreuung, Unterstützung, Hinweise und Ratschläge bei der Durchführung und Erstellung dieser Arbeit.

Meinen Dank aussprechen möchte ich außerdem Frau Cassens und Frau Hild für die freundliche und umfangreiche Unterstützung und Hilfe bei den labortechnischen Arbeiten.

Bedanken möchte ich mich auch bei Niels Hahn, der mir sowohl bei labortechnischen Fragen, als auch bei der Erstellung dieser Arbeit behilflich war.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken für all die Hilfe, Unterstützung und Ratschläge, während der Erstellung dieser Arbeit und auch des gesamten Studiums.

---

## Lebenslauf

Name:	Tim Ralf Claßen
Geburtsdatum/-ort:	11.11.1977 in Krefeld
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Konfession:	katholisch
Schulbildung:	1984-1988 Grundschule Oberbruch in Krefeld 1988-1997 Maria-Sybilla-Merian Gymnasium, Krefeld
Zivildienst:	09/97-12/97 Rettungshelfer beim Arbeiter-Samariter-Bund, Krefeld  01/98-09/98 Zivildienst auf der chirurgischen Intensivstation im Klinikum Krefeld
Studium:	10/1998-09/2003 Studium der Humanmedizin, Justus- Liebig Universität, Gießen  10/2003-10/2004 Studium der Humanmedizin, RWTH, Aachen  09/2000 Physikum 09/2001 1. Staatsexamen 09/2003 2. Staatsexamen 11/2004 3. Staatsexamen